

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dissertação de Mestrado Acadêmico

**Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo
 β -cariofileno nanoemulsionado**

JONATHAN PARISOTTO PETERLE

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo
 β -cariofileno nanoemulsionado**

Dissertação apresentada por **Jonathan
Parisotto Peterle** para a obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester
Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiana Lima Dora

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e **aprovada** em **5 de maio de 2017**, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Parisotto-Peterle, Jonathan

Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo beta-cariofileno nanoemulsionado / Jonathan Parisotto-Peterle. -- 2017.

157 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Coorientadora: Cristiana Lima Dora.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Beta-cariofileno. 2. Cicatrização cutânea. 3. Nanoemulsão. 4. Hidrogel. 5. Tecnologia farmacêutica. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Dora, Cristiana Lima, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Toxicologia (LABTOXI) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, e no Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), na cidade de Rio Grande, RS. O presente trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O autor desta dissertação recebeu bolsa de estudos da CAPES durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Reservo este espaço para expressar minha enorme gratidão a algumas pessoas, pois sem elas, a conclusão deste trabalho não seria possível. À minha família, especialmente minha mãe, **Maria Teresa Parisotto**, pela minha formação, educação, compreensão, exemplo, apoio e, principalmente, seu amor incondicional. Dedico a você mais esta conquista!

À minha orientadora, Profa. Dra. **Letícia Scherer Koester**, pela oportunidade, confiança, profissionalismo e dedicação que orientou este trabalho!

À minha co-orientadora Prof. Dra. **Cristiana Lima Dora** e à Prof. Dra. **Juliana Bidone** pela compreensão, paciência, confiança e ajuda no desenvolvimento dos experimentos *in vivo*. Vocês foram essenciais neste trabalho!

Ao Prof. Dr. **Valdir Florêncio da Veiga Júnior** pela doação de matéria-prima e colaboração neste trabalho!

À Prof. Dra. **Renata Pereira Limberger** e à doutoranda **Maíra Kerpel dos Santos**, do Laboratório de Toxicologia (LABTOXI) da UFRGS, pela confiança, ensinamentos e espaço cedido em seu laboratório para a realização deste trabalho!

Às melhores amigas que a vida me presenteou, **Bibiana Cardoso, Raquel Guerra, Gabriela Meirelles, Camila Zimmer, Fernanda Pruvinielli, Mirella Nicolaou, Gisele Grigolo** e aos meus demais amigos. Obrigado pela companhia, pelos momentos únicos que passamos juntos, conselhos, e principalmente, por me ensinar o verdadeiro significado da palavra **amizade**! Cada página deste trabalho contém o sorriso de vocês!

À minha melhor amiga-irmã **Émilin Dreher de Lima**, por permitir dividir comigo mais esta vitória pessoal e profissional! Sua amizade e companhia foram um dos melhores presentes que a graduação (e a vida) me proporcionou!

Aos meus **colegas** e **amigos** do **LDG**, pelo companheirismo, amizade, ensinamentos, risadas e pela ótima convivência!

À **CAPES**, órgão financiador da bolsa de estudos recebida durante a realização deste trabalho!

À **Deus**, obrigado por tudo! E por todos!

“Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas, aprendi também, que posso ir muito além dos limites que eu próprio coloquei.”

Charles Chaplin

ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE HIDROGEL CONTENDO β -CARIOFILENO NANOEMULSIONADO

RESUMO

O β -cariofileno é um composto presente no óleo de diversas espécies vegetais, como as copaibeiras, e sua atividade frente a cicatrização cutânea ainda não está elucidada. O objetivo deste estudo foi produzir um hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado, e avaliar os perfis de liberação/permeação cutânea *in vitro* e a atividade cicatrizante *in vivo*. Para a nanoemulsão empregou-se um homogeneizador a alta pressão, e para o hidrogel, dispersão direta com Natrosol[®]. As formulações foram caracterizadas de acordo com o tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta e teor (CG/MS). Nos estudos de liberação/permeação cutânea utilizou-se células tipo *Franz*. No estudo da atividade cicatrizante, empregou-se o modelo de feridas dorsais em ratos *Wistar*, avaliando o tamanho das lesões, marcadores de atividades anti-inflamatória, antioxidante e análise histológica, durante 12 dias. Após caracterizadas, as formulações desenvolvidas apresentaram-se estáveis durante 60 dias. No estudo de permeação cutânea, observou-se que o β -cariofileno puro não foi capaz de atravessar o estrato córneo da pele. Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações na quantidade de β -cariofileno retido na derme, sugerindo haver uma situação de saturação. O estudo de liberação indicou maior cedência do β -cariofileno a partir da forma nanoemulsionada do que do hidrogel derivado. No estudo da atividade cicatrizante, o fechamento inicial da ferida foi alcançado em menos tempo no grupo tratado com o hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado (GHN β), indicando um efeito anti-inflamatório nesta formulação. Já a análise histológica indicou que o GHN β apresentou resultados semelhantes ao do grupo controle positivo (Dersani[®]), mostrando-se eficaz para a reparação tecidual cutânea.

Palavras-chave: β -cariofileno; Cicatrização cutânea; Hidrogel; Nanoemulsão.

STUDY OF HEALING ACTIVITY OF HYDROGEL CONTAINING β -CARYOPHYLLENE NANOEMULSIFIED

ABSTRACT

β -caryophyllene is a compound present in the oil of many plant species, such as copaibeiras, and the healing activity is still being studied. The objectives of this study was to produce a hydrogel containing β -caryophyllene nanoemulsified and to evaluate the *in vitro* release and permeation profile, and the *in vivo* healing activity, yet unexplored. For the nanoemulsion, a high pressure homogenizer was used, and for the hydrogel, direct dispersion with Natrosol[®]. The formulations were characterized according to droplet size, PDI, zeta potential and content (GC/MS). In the release/permeation studies, Franz type cells were used. The study of the healing activity, the dorsal wound model was used in Wistar rats, evaluating lesion size, markers of anti-inflammatory and antioxidant activities, and histological analysis, for 12 days. After characterization, the formulations developed were stable for 60 days. In skin permeation study, was observed that the pure β -caryophyllene was not able to cross the stratum corneum. No significant differences were observed between the formulations in the amount of β -caryophyllene retained in the dermis, suggesting a saturation condition. The release study indicated higher yield of β -caryophyllene from the nanoemulsion form than from the derived hydrogel. In the study of healing activity, the initial closure of the wound was achieved in less time in the group treated with the hydrogel containing β -caryophyllene nanoemulsion (GHN β), indicating an anti-inflammatory effect in this formulation. The histological analysis indicated that GHN β presented similar results that of the positive control group (Dersani[®]), proving to be effective for cutaneous tissue repair.

Keywords: β -caryophyllene; Wound Healing; Hydrogel; Nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estrutura química do β -cariofileno	31
Figura 2. Representação do processo de cicatrização de feridas	40
Figura 3. Representação gráfica das 5 fases do processo de cicatrização	45
Figura 4. Representação da rede polimérica de hidrogéis físicos e químicos	51

PARTE EXPERIMENTAL

Figura 1. Perfil de retenção do β -cariofileno ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em pele íntegra, ferida superficial e ferida profunda simuladas	87
Figura 2: Estudo de liberação do β -cariofileno presente nas formulações ...	88
Figura 3. Porcentagem de contração das feridas	92
Figura 4. Fotografias representando a contração das feridas nos diferentes tratamentos ao longo do tempo	94
Figura 5. Concentração de mieloperoxidase (MPO) presente nas feridas no 2º dia do experimento <i>in vivo</i>	95
Figura 6. Concentração de fator de necrose tumoral <i>alfa</i> (TNF- α) presente nas feridas no 2º dia do experimento <i>in vivo</i>	97
Figura 7. Concentração de interleucina-1 (IL-1) presente nas feridas no 2º dia do experimento <i>in vivo</i>	98
Figura 8. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presente nas feridas no 2º dia do experimento <i>in vivo</i>	99
Figura 9. Representação da análise histológica das feridas durante o experimento <i>in vivo</i>	101

APÊNDICE 1

Figura 1. Cromatograma obtido em CG/MS da amostra de β -cariofileno ...	133
Figura 2. Cromatograma da região A obtido em CG/MS	134
Figura 3. Cromatograma da região B obtido em CG/MS	135
Figura 4. Espectro de massas do β -cariofileno, obtido em CG/MS	136

APÊNDICE 2

Figura 1. Acompanhamento do tamanho de gotícula das nanoemulsões e hidrogéis derivados durante 60 dias	145
Figura 2. Acompanhamento do índice de polidispersão (PDI) das nanoemulsões e hidrogéis derivados durante 60 dias	146
Figura 3. Acompanhamento do potencial zeta das nanoemulsões e hidrogéis derivados durante 60 dias	147
Figura 4. Acompanhamento do teor de β -cariofileno das nanoemulsões e hidrogéis derivados durante 60 dias	149

ANEXO 1

Figura 1. Parecer de aprovação emitido pela CEUA/FURG	157
--	------------

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Principais citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização	41
Tabela 2. Polímeros hidrofílicos utilizados na produção de hidrogéis	52

PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 1. Valores obtidos nos testes de caracterização de três lotes de nanoemulsões e hidrogéis derivados, 1 dia após a preparação	83
Tabela 2. Evolução do peso dos ratos ao longo do experimento <i>in vivo</i>	90
Tabela 3. Evolução da temperatura das feridas nos ratos ao longo do experimento <i>in vivo</i>	93

APÊNDICE 1

Tabela 1. Composição química da amostra de β -cariofileno obtida por CG/MS, com os respectivos nomes dos compostos, tempos de retenção, índices de retenção (IR) e concentrações	134
---	------------

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	25
REVISÃO DE LITERATURA	
1. β-cariofileno	31
2. Pele: Estrutura e processo de permeação de fármacos	34
3. Feridas e processo de cicatrização	37
4. Sistemas nanoemulsionados	46
5. Hidrogéis	50
6. Referências	53
PARTE EXPERIMENTAL	
ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE HIDROGEL CONTENDO β-CARIOFILENO NANOEMULSIONADO	
1. Introdução	71
2. Materiais e Métodos	73
<i>2.1 Substâncias químicas e reagentes</i>	<i>73</i>
<i>2.2 Instrumentalização e condições cromatográficas</i>	<i>73</i>
<i>2.3 Determinação de β-cariofileno das amostras</i>	<i>74</i>
<i>2.4 Caracterização da amostra de β-cariofileno</i>	<i>74</i>
<i>2.5 Preparação das formulações contendo β-cariofileno</i>	<i>74</i>
<i>2.6 Caracterização das formulações contendo β-cariofileno</i>	<i>75</i>
<i>2.7 Estudo de permeação/retenção cutânea in vitro</i>	<i>76</i>
<i>2.8 Estudo de liberação in vitro</i>	<i>77</i>
<i>2.9 Estudo da atividade cicatrizante in vivo</i>	<i>77</i>
<i>2.9.1 Animais</i>	<i>77</i>
<i>2.9.2 Modelo de cicatrização de feridas</i>	<i>78</i>
<i>2.9.3 Determinação de mieloperoxidase (MPO)</i>	<i>79</i>
<i>2.9.4 Determinação de citocinas (IL-1 e TNF-α)</i>	<i>79</i>

2.9.5	Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .	80
2.9.6	Determinação de proteínas totais	80
2.10	<i>Análise histológica</i>	80
2.11	<i>Análise estatística</i>	81
2.12	<i>Aspectos éticos</i>	81
2.13	<i>Descarte de resíduos</i>	81
3.	Resultados e Discussão	82
3.1	<i>Caracterização da amostra de β-cariofileno</i>	82
3.2	<i>Desenvolvimento das formulações contendo β-cariofileno</i>	82
3.3	<i>Caracterização das formulações contendo β-cariofileno</i>	83
3.4	<i>Estudo de permeação/retenção in vitro</i>	85
3.5	<i>Estudo da atividade cicatrizante in vivo</i>	88
3.5.1	Aspectos gerais	88
3.5.2	Área superficial e contração das feridas	91
3.5.3	Determinação de mieloperoxidase (MPO)	94
3.5.4	Determinação de citocinas (IL-1 e TNF- α)	96
3.5.5	Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .	98
3.6	<i>Análise histológica</i>	99
4.	Conclusão	102
5.	Agradecimentos	103
6.	Referências	103
DISCUSSÃO	113
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	119
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICE 1:	Estudo de identificação da amostra de β-cariofileno	131
APÊNDICE 2:	Monitoramento dos parâmetros de estabilidade das formulações	143
ANEXO 1:	Parecer CEUA	157

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é descrita desde os primórdios da civilização. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de espécies vegetais em desordens do organismo contribui de maneira decisiva na divulgação de seus efeitos biológicos, ainda que em muitos casos, não sejam completamente conhecidos seus constituintes químicos (MACIEL, 2002).

O beta-cariofileno (β -cariofileno, BTC ou *trans*-cariofileno) é um sesquiterpeno bicíclico presente naturalmente no óleo essencial de diversas plantas, como por exemplo, *Cannabis sativa* (RUSSO, TAMING, 2011; SILVA et al., 2011), *Copaifera* sp. (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; VEIGA-JUNIOR et al., 2007), *Cordia verbenaceae* (MICHIELIN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012) e outras espécies vegetais. Um breve levantamento de informações em literatura sobre o efeito deste composto revelou importantes aplicações etnofarmacológicas, e aos poucos, suas atividades vêm sendo comprovadas por meio de estudos científicos. Dentre os efeitos comprovados destacam-se atividades anti-inflamatória (ABBAS et al., 2013; PAULA-FREIRE et al., 2014), antitumoral (KUBO et al., 1996; DI SOTTO et al., 2010; AMIEL et al., 2012), antimicrobiana oral (MOON, KIM, CHA, 2011), assim como ação contra os parasitas causadores da doença de Chagas e da leishmaniose (LEITE et al., 2013; SOARES et al., 2013). Há também estudos que relatam o efeito de cicatrização cutâneo do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.), que apresenta β -cariofileno como componente majoritário. Segundo os pesquisadores, a atividade cicatrizante pode estar diretamente relacionada ao efeito anti-inflamatório, entretanto, os resultados encontrados na literatura são controversos (BRITO et al., 1998; PAIVA et al., 2002; VIEIRA et al., 2008; MOURA-ESTEVÃO et al., 2009). A possibilidade de obter o β -cariofileno isolado e a carência de estudos aprofundados abrem novas perspectivas para a investigação da atividade cicatrizante deste composto.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) com interesse para o tratamento tópico de inflamações. Em um primeiro momento, foi desenvolvido e validado um método para quantificação de β -cariofileno em nanoemulsões, utilizando microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa com

detecção por ionização de chama (CG/FID) (DIAS et al., 2012). Em um estudo subsequente, foi otimizada a preparação das nanoemulsões por homogeneização à alta pressão (DIAS et al., 2014), seguido da incorporação em hidrogéis (LUCCA, 2013). Mais recentemente, foi desenvolvido e validado um método para a quantificação de β -cariofileno nas camadas cutâneas utilizando *headspace* e cromatografia gasosa acoplado a um detector de massas (CG/MS) (LUCCA et al., 2015). Lucca e colaboradores (2015) também verificaram que a partir da nanoemulsão contendo o óleo de copaíba, o β -cariofileno foi capaz de permear até a derme, enquanto que a partir do óleo bruto, o composto ficou retido apenas no estrato córneo, destacando, assim, a importância do sistema nanoemulsionado na permeação cutânea deste composto.

Embora o β -cariofileno possua grande aplicabilidade na terapêutica, este é caracterizado pelo caráter lipofílico, apresentando um coeficiente de partição (log P) de $6,78 \pm 0,25$, tornando pouco agradável à aplicação direta sobre a pele (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002). A associação deste óleo a estruturas nanoemulsificadas tende a melhorar a sensação sobre a pele, além de permitir maior permeação das moléculas através da pele, e até mesmo, formar um sistema de depósito nas camadas cutâneas, devido ao reduzido tamanho de gotícula e a alta área superficial (MASON, WILKING, MELESON, 2006; SHAKEEL et al., 2007).

As nanoemulsões, contudo, apresentam baixa viscosidade, sendo necessário o espessamento, por exemplo, em um hidrogel. Este apresenta aspecto sensorial agradável e não apresenta afinidade pelo núcleo oleoso da nanoemulsão, facilitando assim, sua liberação da matriz polimérica (ZHU et al., 2009).

Dessa forma, tendo em vista os aspectos abordados, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado e avaliar o efeito cicatrizante desta formulação em modelo animal (*in vivo*), bem como traçar os perfis de liberação e permeação cutânea (em diferentes condições de lesões) *in vitro* do composto quando aplicado diretamente sobre a pele, e também na forma nanoemulsionada e espessada em hidrogel.

OBJETIVO GERAL

- Produzir e caracterizar um hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado e avaliar o efeito cicatrizante desta formulação em modelo animal (*in vivo*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de preparação da nanoemulsão contendo β -cariofileno, com base em formulação já otimizada para o óleo de copaíba, em trabalho anterior;
- Avaliar a influência da incorporação da nanoemulsão contendo β -cariofileno em hidrogel em relação ao teor de marcador e estabilidade da formulação, realizando acompanhamento por 60 dias;
- Avaliar a permeação/retenção cutânea (em diferentes condições de simulação de lesão) e liberação *in vitro* do β -cariofileno, a partir das formulações (nanoemulsão incorporada e não incorporada em hidrogel), empregando célula de difusão vertical do tipo *Franz*;
- Avaliar o efeito de cicatrização *in vivo* do β -cariofileno puro e o mesmo nanoemulsionado e espessado em hidrogel, empregando o modelo animal de feridas dorsais e ratos *Wistar*.

Este t3pico abordar3 uma revis3o de literatura acerca dos principais temas discutidos ao longo desta disserta33o, como os aspectos gerais e as atividades biol3gicas do β -cariofileno, estrutura da pele e anexos cut4neos, permea33o cut4nea de f3rmacos, no33es sobre feridas, processo de cicatriza33o e a import4ncia do emprego de nanoemuls3es e hidrog3is na 3rea farmac3utica.

1. β -cariofileno

O β -cariofileno (**Figura 1**) é um hidrocarboneto volátil, de fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, que apresenta um odor picante de madeira, coloração levemente amarelada e fracamente solúvel em água (SKÖLD et al., 2006). É um sesquiterpeno bicíclico presente naturalmente no óleo essencial de diversas plantas, como *Cannabis sativa* (RUSSO, TAMING, 2011; SILVA et al., 2011), *Copaifera* sp. (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; VEIGA-JUNIOR et al., 2007), *Cordia verbenaceae* (MICHIELIN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012), *Eugenia caryophyllata* (CHAIEB et al., 2007), *Piper nigrum* L. (POLITEO, JUKI, MILO, 2006), *Zingiber nimmonii* (SABULAL et al., 2006), dentre muitas outras espécies vegetais. Apesar de apresentarem em sua composição β -cariofileno em seus óleos brutos, a concentração do composto difere de espécie para espécie e família botânica, assim como, da influência de fatores climáticos e nutricionais do solo (CASCON, GILBERT, 2000; REIS, MARIOT, STEENBOCK, 2004).

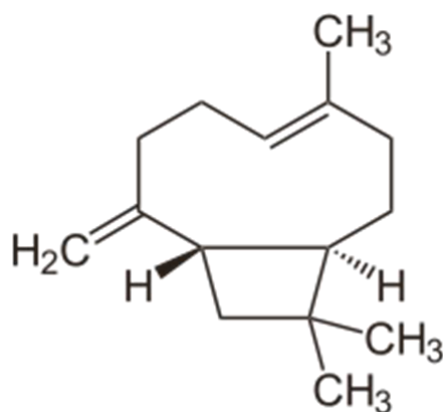


Figura 1. Estrutura química do β -cariofileno

Devido às suas características organolépticas, o β -cariofileno tem sido comumente empregado pelas indústrias alimentícia e cosmética como flavorizante e aromatizante em produtos, e desde a década de 30, vem sendo utilizado na fixação de fragrâncias em perfumes e produtos de higiene pessoal (SKÖLD et al., 2006).

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados com este composto, revelando importantes propriedades farmacológicas de interesse clínico. Dentre as

atividades biológicas pesquisadas no âmbito científico destaca-se uma potente ação anti-inflamatória no tratamento de doenças e dores crônicas (MARTIN et al., 1993; GHELARDINI et al., 2001; CHO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; GERTSCH et al., 2008; LIMA et al., 2012; ABBAS et al., 2013; PAULA-FREIRE et al., 2014). O seu mecanismo de ação ainda está sendo elucidado, entretanto, suspeita-se que composto seja capaz de bloquear as ciclo-oxigenases (COX-1 e/ou COX-2), mecanismo semelhante ao dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (GOMES et al., 2007). Segundo Gertsch e colaboradores (2008), tal molécula apresenta também uma interação agonista com os receptores canabinóides tipo 2 (CB2).

O β -cariofileno também tem demonstrado atividade antitumoral (KUBO et al., 1996; DI SOTTO et al., 2010; AMIEL et al., 2012) frente a linhagens celulares de hepatócitos, células gástricas e cervicais escamosas (JUN et al., 2011). Um estudo realizado por Legault e Pichette (2007) verificou um sinergismo citotóxico do composto associado com Paclitaxel[®], medicamento antineoplásico utilizado no tratamento do câncer de mama e carcinoma de ovário. Já Yang e colaboradores (2015) verificaram um potencial antimelanogênico do β -cariofileno quando este foi administrado diretamente em células epiteliais de camundongos com melanoma.

Outras aplicações biológicas são relatadas na literatura, como ação anestésica local com efeito semelhante ao da procaína (mas inferior a morfina) (GHELARDINI et al., 2001) e atividade contra os patógenos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*, agentes causadores da doença de Chagas e leishmaniose, respectivamente, sugerindo uma alternativa ao tratamento tradicional, que atualmente conta com a administração oral de benzonidazol e antimônio pentavalente, que apresentam elevados efeitos adversos (LEITE et al., 2013; SOARES et al., 2013). Também, destaca-se a ação antimicrobiana oral sinérgica do β -cariofileno com o eugenol, contra bactérias do gênero *Streptococcus* sp. oral, capazes de reduzir a incidência cariogênica (MOON, KIM, CHA, 2011). Uma pesquisa realizada por Gelmini e colaboradores (2013), observou atividade antiproliferativa em lesões cutâneas em portadores de psoríase com eczema

recalcitrante, apresentando baixos efeitos adversos e uma melhora clínica frente à terapia farmacológica convencional, na qual são utilizados corticosteroides e análogos da vitamina D.

Alguns estudos realizados por pesquisadores brasileiros revelaram um efeito de cicatrização cutâneo do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) (PAIVA et al., 2002; MOURA-ESTEVÃO et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2012), no qual o β -cariofileno é o composto majoritário em diferentes espécies (*C. multijuga*, *C. langsdorffii*, *C. cearensis*, *C. reticulata*, *C. duckei* e *C. pubiflora*), e a concentração pode variar de 30 a 64% (BARBOSA et al., 2012). Um estudo *in vivo* realizado por Paiva e colaboradores (2002) revelou um progresso significativo na cicatrização de feridas utilizando óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). Moura-Estevão e colaboradores (2009) relataram uma aceleração na reparação tecidual de retalhos cutâneos em ratos *Wistar* tratados com óleo de copaíba da espécie *C. langsdorffii*, e Nogueira e colaboradores (2012) observaram um aumento da proliferação celular *in vitro* utilizando o mesmo óleo. Contudo, não há ainda estudos que relacionam diretamente o efeito de cicatrização ao β -cariofileno e, na maioria das vezes, os estudos etnofarmacológicos prevalecem sobre os estudos experimentais.

Cabe destacar neste contexto que, em 2005, foi introduzido no mercado brasileiro o primeiro fitomedicamento com base tecnológica totalmente nacional, o Acheflan[®], produzido pela indústria farmacêutica Aché. Este medicamento possui indicação anti-inflamatória, de uso tópico, cujo princípio ativo é o α -humuleno, também chamado de α -cariofileno. Este é um dos componentes do óleo essencial extraído da *Cordia verbenacea*, planta utilizada pela medicina popular com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-ulcerogênicas, antirreumáticas e analgésicas (CALIXTO, 2005; NATÉRCIA, 2005). Em um estudo realizado por Perini e colaboradores (2015), os pesquisadores utilizaram este fitomedicamento em feridas de ratos *Wistar*, a fim de verificar a atividade cicatrizante. Ao final do estudo, foi observado que o Acheflan[®] acelerou o processo de cicatrização, aumentando a angiogênese e o remodelamento dérmico, estimulando a produção das fibras de colágeno. Os autores salientaram que novos

estudos deveriam ser realizados, visto que o produto comercial apresentava não somente α -cariofileno, mas também β -cariofileno e outros compostos em baixas concentrações, principalmente à dificuldade de se realizar uma separação total destes compostos. Dessa forma, não foi possível inferir se a atividade cicatrizante do medicamento foi devido a algum componente específico ou ao óleo de *Cordia verbenacea*.

Por outro lado, Brito e colaboradores (1998) relataram em seu estudo que a utilização do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) em feridas cutâneas de ratos *Wistar* apresentou um aumento no tamanho da crosta das lesões e presença de escarras com perda de pelos em torno da ferida. Para Vieira e colaboradores (2008), a utilização do óleo de *C. langsdorffi* influenciou de maneira negativa o processo de cicatrização.

Apesar de todos os estudos empregarem óleos de diferentes espécies vegetais para o delineamento de seus experimentos, não há subsídios capazes de inferir ou atribuir o efeito cicatrizante a este componente, pois na maioria dos estudos citados, os pesquisadores não realizaram uma análise para determinar exatamente os componentes presentes nos óleos utilizados. Ressalta-se ainda que a presença de outros compostos existentes pode apresentar influência sinérgica ou antagônica à atividade de interesse. Também, diferentes espécies de plantas sintetizam óleos brutos com diferentes concentrações de componentes. Dessa forma, não há ainda estudos científicos suficientes que demonstrem a atividade cicatrizante do β -cariofileno. A possibilidade em se obter o composto isolado e a carência de estudos aprofundados abriram novas perspectivas para investigar se tal sucesso na atividade apresentada em estudos prévios com óleos vegetais é decorrente ao composto em estudo.

2. Pele: Estrutura e processo de permeação de fármacos

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo 16% do peso corporal. Além de revestir e proteger a superfície externa do corpo, possui papel imprescindível no controle da temperatura corporal, percepção sensorial, aspectos estéticos, absorção de radiação ultravioleta (UV), síntese de vitamina D,

entre outras funcionalidades (HARRIS, 2003; RIBEIRO, 2010; SOBOTTA, 2013). É um dos tecidos que mais sofrem transformações com o avançar da idade, levando não só a alterações no sistema tegumentar, como também, na imunidade celular, refletindo no estado físico e emocional do indivíduo. Manter a integridade cutânea é de extrema importância na prevenção das mais diversas doenças que afetam o organismo (NETTINA, 2013).

A pele é classificada como pilosa, que reveste maior parte do corpo; glabra, presente na palma das mãos e planta dos pés; e orificial, encontrada entre a pele pilosa e as mucosas (MICHALANY, MICHALANY, 2002). A espessura cutânea depende da área do corpo, sendo mais espessa em regiões sujeitas à pressão e atritos constantes. Morfologicamente, a pele é constituída por três camadas básicas: epiderme, derme e hipoderme (HARRIS, 2003; RIBEIRO, 2010; SOBOTTA, 2013).

A epiderme é caracterizada por uma complexa estrutura constituída por diferentes camadas de queratinócitos e células epiteliais estratificadas, que sofreram diferenciação celular à medida que migraram da camada basal para a superfície da pele (MORETTO et al., 1999; RIBEIRO, 2010). A estrutura epidérmica é formada por cinco estratos. O primeiro deles é o basal ou germinativo, no qual originam as demais camadas que formam a epiderme, e é nesta região em que se observa a maior proliferação celular. O segundo estrato é o espinhoso, formado por várias camadas de células achatadas e coesas entre si, chamadas de células de *Malpighi*. O terceiro estrato é o granuloso, ricamente composto por lipídios e proteínas, apresentando também, grânulos proteicos provenientes da camada espinhosa. O quarto estrato é o lúcido, presente em regiões onde não há presença de folículos pilosos, como na palma das mãos e na planta dos pés, e é formado por uma camada de células achatadas, ricas em grânulos de querato-hialina. O estrato córneo é a última camada da epiderme, resultado final do processo de diferenciação celular pelo qual passam os queratinócitos, e atua como uma importante barreira para o organismo frente ao ambiente. É constituído por células escamosas, achatadas, anucleadas e com citoplasma rico em queratina, chamadas de corneócitos (LIN et al., 1998;

MORETTO et al., 1999; RIBEIRO, 2010). Estão presentes na epiderme também as células de *Langerhans*, que atuam como apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (LIN et al., 1998).

A derme, segunda camada da pele, está localizada logo abaixo da epiderme e acima da hipoderme. É formada por um tecido resistente e elástico, que proporciona resistência física ao corpo frente a agressões mecânicas, fornece nutrientes e sustentação à epiderme, e abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, mastócitos, fibroblastos, dentre outras estruturas. A derme é dividida em duas regiões: a papilar (logo abaixo da epiderme) e a reticular (abaixo da região papilar). A primeira delas é menos espessa, rica em fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo, constituída essencialmente por colágeno tipo III e vasos sanguíneos de menor calibre. Já a camada reticular é formada por cadeias entrelaçadas de colágenos tipo I e tipo III, além de apresentar vasos sanguíneos de maior calibre, associados à matriz extracelular, formada por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas (WEINSTEIN, BOUCEK, 2003; SOUZA, VARGAS, 2004; WOLFF et al., 2011). O principal componente fibroso da derme é o colágeno, responsável pela resistência tensional da estrutura cutânea (WEINSTEIN, BOUCEK, 2003). Na pele adulta, a quantidade de colágeno presente na derme é de, aproximadamente, 90% do tipo I e 10% do tipo III (BRINK, STALLING, NICOLL, 2005). Estima-se que haja uma redução em cerca de 1% ao ano da biossíntese, e da quantidade total de colágeno, a partir da vida adulta. A produção e deposição desta fibra exercem papel imprescindível no processo de cicatrização, uma vez que a modulação, migração e proliferação celular garantem a eficácia do processo de reparo cutâneo (CUTTLE et al., 2004; BRINK, STALLING, NICOLL, 2005). A elastina é outra importante proteína presente na derme, sendo o principal componente proteico das fibras elásticas, e encontram-se entrelaçadas com as fibras colágenas tipo I e tipo III (WEINSTEIN, BOUCEK, 2003).

Na derme encontram-se também os apêndices cutâneos, como as glândulas sudoríparas (responsáveis pela secreção de suor e equilíbrio homeostático), glândulas sebáceas (responsáveis pela excreção de um óleo com função de

hidratação e barreira hidrorrepelente), folículos pilosos (responsáveis pela formação de pelos e cabelos) e unhas (função protetora da extremidade dos dedos) (RIBEIRO, 2010; SOBOTTA, 2013).

A última camada da pele é a hipoderme, formada basicamente por adipócitos e sua espessura varia conforme a constituição física de cada indivíduo. Além disso, a hipoderme mantém a temperatura do corpo e acumula energia para o desempenho das funções biológicas (MORETTO et al., 1999; RIBEIRO, 2010; SOBOTTA, 2013).

O processo de absorção cutânea descreve a passagem de compostos através da pele, sendo dividido em três fases: penetração (entrada de uma substância em uma das camadas da pele), permeação (passagem de uma substância de uma camada para outra) e reabsorção (absorção no sistema circulatório e posterior distribuição tecidual). Dependendo das características do fármaco, este poderá ficar retido em alguma camada específica da pele, ou então ser absorvido e ir para a corrente sanguínea. Entretanto, existem desafios para esta via de administração, já que o estrato córneo é uma importante barreira micrométrica que regula a passagem de agentes externos, tornando-se, assim, um passo limitante da penetração cutânea (CROSERÀ, BIVENZI, MAINA, 2009; CEVC, VIERL, 2010; PROW et al., 2011; BOLZINGER et al., 2012; SOARES et al., 2015). A permeação cutânea de um fármaco não depende apenas de suas propriedades físico-químicas, mas também do seu comportamento junto ao veículo farmacêutico e da condição da pele (ALLEN JR, POPVICH, ANSEL, 2013).

3. Feridas e processo de cicatrização cutânea

Quando a integridade tegumentar é rompida, seja por fatores físicos, químicos ou biológicos, a superfície do tecido fica exposta, e dessa forma, há a formação de uma lesão, também chamada de ferida (GOGIA, 2003). Esta lesão pode ser causada por agentes extrínsecos, a partir de incisões cirúrgicas, ferimentos acidentais, zonas de pressão e isquemia externa; ou intrínsecos, a partir de infecções, alterações vasculares, isquemias internas, defeitos metabólicos e neoplasias (MENECHIN, VATTIMO, 2003).

As feridas podem ser classificadas em quatro grandes grupos. Quanto à profundidade, uma ferida pode ser denominada superficial ou epidérmica, na qual apenas a epiderme é lesionada; de espessura parcial, onde a epiderme e parte da derme são atingidas, incluindo folículos capilares e as glândulas sudoríparas; ou de espessura total, quando há destruição de todas as camadas cutâneas, podendo atingir ossos e músculos (GOGIA, 2003; MENEGHIN, VATTIMO, 2003; ISAAC et al., 2010).

Quanto ao tempo de evolução à cura, as feridas podem ser classificadas como agudas, oriundas de eventos traumáticos, com ruptura de vasos sanguíneos, porém de rápida hemostasia; ou crônicas, caracterizadas por lesões de longa duração e difícil cicatrização. Nas feridas crônicas, verifica-se um desvio do processo de cicatrização fisiológico, devido a algum quadro infeccioso ou irritação local recorrente (ISAAC et al., 2010). Úlceras diabéticas, arteriais e por pressão, são exemplos, e devem ser tratadas como um grande problema de saúde pública. De acordo com Mustoe, O'íshaughnessy e Kloeters (2006), nos Estados Unidos, este problema afeta inúmeros pacientes, principalmente os idosos, gerando um gasto de bilhões de dólares ao ano. Os autores destacam também o elevado número de lesões de pele causadas por neoplasias, doenças cardiovasculares e diabetes.

Quanto ao conteúdo microbiano, as feridas podem ser denominadas como limpas ou assépticas, quando as lesões são formadas através de incisões cirúrgicas, em ambiente isento de micro-organismos patogênicos; limpas contaminadas, quando as lesões são formadas em ambientes com pouca contaminação ou são tratadas em até 6 horas após o trauma; contaminadas, quando as feridas já estão colonizadas com uma quantidade considerável de micro-organismos; ou infectadas, quando as feridas já estão contaminadas com micro-organismos e apresentam intensa reação inflamatória, destruição de tecidos, exsudato purulento e odor característico (GOGIA, 2003).

Por fim, as feridas podem ser classificadas quanto a sua etiologia, podendo ser acidentais ou traumáticas, quando provocadas por descuido com instrumentos cortantes, perfurantes e lacerantes; intencionais ou cirúrgicas, quando causadas

com um propósito terapêutico; patológicas, através de lesões secundárias a uma determinada doença; iatrogênicas, decorrente de procedimentos ou tratamentos médicos; ou provocados por fatores externos, como a aplicação contínua da pressão exercida pelo peso do corpo, fricção, cisalhamento e umidade (GOGIA, 2003; MENEGHIN, VATTIMO, 2003).

Um tipo especial de feridas que desperta grande cuidado dos profissionais da saúde são as queimaduras. Dados da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) revelaram que há em torno de um milhão de queimaduras por ano no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS, 2016), sendo as crianças as mais afetadas, representando a quarta maior causa de óbito infantil. Estas lesões cutâneas são provocadas por fontes de calor, eletricidade, substâncias químicas ou radiação, e tornam-se perigosas principalmente quando afetam as camadas mais profundas da pele (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS, 2016). As queimaduras graves, extensas e profundas levam a destruição da epiderme, derme e tecidos subcutâneos. Desta maneira, o organismo fica exposto a uma série de agressores presentes no ambiente, o que pode comprometer a recuperação espontânea da pele e, em muitas vezes, pode levar o paciente a óbito. Sabe-se que, dependendo da gravidade da lesão, o tempo de internação para a reparação do tecido lesionado eleva ainda mais os custos para o sistema de saúde (PASE et al., 2012).

Além das feridas crônicas e queimaduras, outras doenças de pele oferecem sérios riscos aos pacientes, como as dermatoses inflamatórias, psoríase e eczema. Estes quadros são provocados por respostas exacerbadas das células do sistema imune na pele. Na última década, foi descoberto que os queratinócitos da epiderme são células altamente ativas nas fases aguda e crônica da inflamação cutânea por meio da ação de citocinas (ALBANESE, PASTORE, 2010). Para tanto, a descoberta de novos fármacos capazes de diminuir a inflamação tecidual e melhorar a regeneração podem melhorar a qualidade de vida destes pacientes. De acordo com Velacchi e colaboradores (2012), as despesas totais com gastos na cicatrização deficiente de feridas inflamatórias crônicas podem comprometer de 2-4% das despesas destinadas à saúde em todo o mundo.

Para reestabelecer a homeostase tecidual, o organismo promove naturalmente um mecanismo de reparação. O processo de cicatrização (**Figura 2**) é composto por 5 etapas, caracterizado por um complexo processo que envolve fenômenos químicos, físicos e biológicos (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

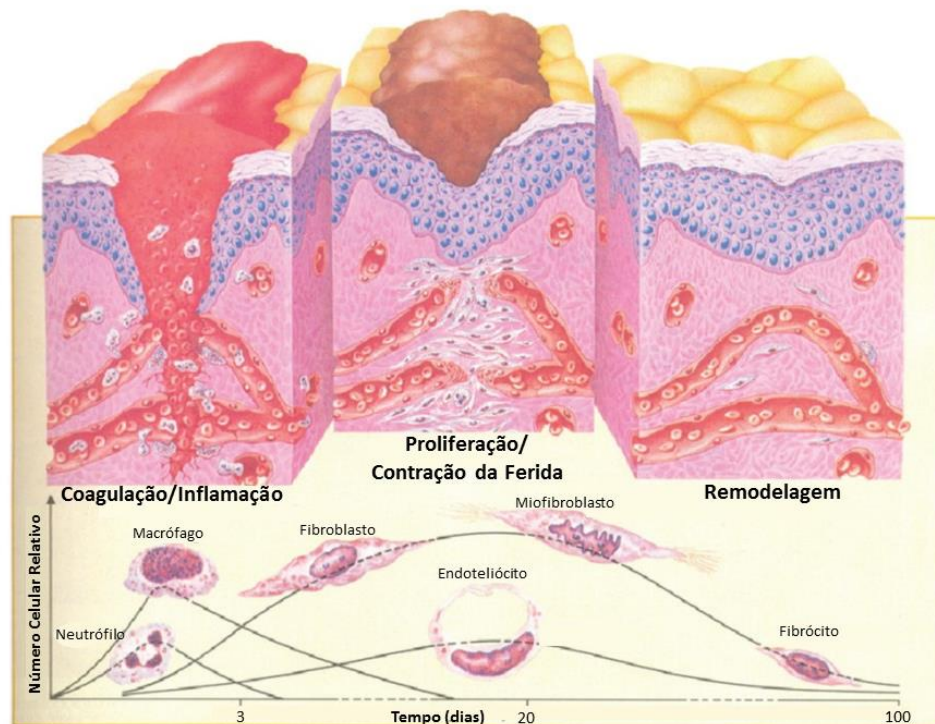


Figura 2. Representação do processo de cicatrização de feridas relacionando o número relativo das principais células envolvidas nas 5 etapas do processo de reparo tecidual (Adaptado de ISAAC et al., 2010)

A primeira etapa, chamada de ‘coagulação’, acontece imediatamente após a formação da lesão. O rompimento do endotélio vascular estimula a deposição de plaquetas sobre a ferida e a ruptura das membranas celulares liberam substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxano A₂, que promovem a hemostasia e evitam a hipovolemia. Desta forma, é iniciada a cascata de coagulação, seguido da formação de um coágulo de fibrinogênio (convertido posteriormente em fibrina pela enzima trombina), cobrindo as bordas da lesão. Também, as plaquetas ativadas liberam grânulos contendo fatores de crescimento (**Tabela 1**) que estimulam a produção de fibroblastos e aumentam o recrutamento de polimorfonucleares e mononucleares para o local da lesão (MANDELBAUM, DI

SANTIS, MANDELBAUM, 2003; CAMPOS, BORGES-FRANCO, GROTH, 2007; ISAAC et al., 2010).

Tabela 1. Principais citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização

Citocinas	Células produtoras	Função
TNF-α (Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>)	Monócitos e linfócitos	* Estimula a proliferação de fibroblastos ^{1,2,3} * Agente quimiotático para neutrófilos e macrófagos ³
TGF-α (Fator de transformação de crescimento <i>alfa</i>)	Matriz extracelular da ferida	* Estimula a proliferação celular e reepitelização ^{1,2,3}
TGF-β (Fator de transformação de crescimento <i>beta</i>)	Plaquetas e matriz extracelular da ferida	* Estimula a proliferação de fibroblastos e formação do tecido de granulação ^{1,3}
PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas	* Agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e fibroblastos ^{1,2,3} * Estimula a proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular ^{2,3}
VEGF (Fator de crescimento derivado do endotélio vascular)	Queratinócitos e macrófagos	* Estimula a angiogênese e proliferação de células endoteliais ^{1,2}
EGF (Fator de crescimento epidérmico)	Plaquetas e macrófagos	* Agente quimiotático para fibroblastos e queratinócitos ^{1,2,3} * Estimula a proliferação de fibroblastos e queratinócitos ²
FGF (Fator de crescimento de fibroblastos)	Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos	* Agente quimiotático e estimula a proliferação de fibroblastos e queratinócitos ^{1,2,3} * Potente fator antigênico ³
KFF (Fator de crescimento de queratinócitos)	Fibroblastos	* Agente quimiotático e estimula a proliferação de fibroblastos ^{1,2,3}
IL-1 (Interleucina-1)	Macrófagos, monócitos, fibroblastos, células dendríticas, linfócitos B e células <i>Natural killer</i>	* Estimula a proliferação de fibroblastos ^{1,2,3}
IFN-γ (Interferon <i>gama</i>)	Macrófagos	* Diferenciação de monócitos em macrófagos ^{1,2,3}

Legenda: ¹BROUGHTON, JANIS, ATTINGER, 2006; ²CAMPOS, BORGES-BRANCO, GROTH, 2007; ³ISAAC et al., 2010

A segunda etapa, chamada de ‘inflamação’, é caracterizada pela presença de 4 sinais (dor, calor, eritema e edema) e está intimamente ligada a etapa de coagulação. O objetivo desta fase é impedir a entrada de agentes agressores, assim como promover a limpeza do tecido lesionado. A resposta inflamatória é imediata,

iniciada com a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de leucócitos para a região da ferida. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, atraídos pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e aderem-se à parede do endotélio mediante ligação às selectinas. Os neutrófilos, também, produzem radicais livres que auxiliam na destruição de corpos estranhos e micro-organismos, e são gradativamente substituídos por macrófagos. Estes possuem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos, assim como na secreção de mais citocinas e fatores de crescimento, que contribuirão na etapa de proliferação celular (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; CAMPOS, BORGES-FRANCO, GROTH, 2007).

Os linfócitos são direcionados à lesão aproximadamente uma semana após o início do processo de cicatrização, e são responsáveis pela resposta imunológica específica, bem como no recrutamento de mais macrófagos ao tecido lesionado. Além das células inflamatórias e das citocinas, a fase inflamatória conta com o importante papel na formação da fibronectina, uma glicoproteína produzida pelos fibroblastos, que une o coágulo de fibrina (produzido na etapa de coagulação), às integrinas celulares, colágeno e heparina presentes na derme, com o intuito de manter a adesão das células que compõem a matriz extracelular. A fibronectina também apresenta propriedades quimiotáticas para leucócitos e promove a opsonização de corpos estranhos e bactérias (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; CAMPOS, BORGES-FRANCO, GROTH, 2007; ISAAC et al., 2010).

A terceira etapa do processo de cicatrização é a ‘proliferação’, responsável pelo fechamento da ferida. Esta fase é dividida em fibroplasia, angiogênese e reepitelização. A primeira é caracterizada pela migração e proliferação dos fibroblastos à lesão, por meio da retroalimentação positiva de neutrófilos, macrófagos e citocinas presentes na fase inflamatória. Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico que constituem a maior quantidade de células do tecido conjuntivo, e são responsáveis pela síntese de proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e colágeno, sendo esta a proteína mais abundante nos seres

humanos e o principal componente da pele, responsável por sua estrutura e resistência. É composto por uma fita tripla helicoidal de três cadeias polipeptídicas de glicina, prolina e lisina, sendo encontrados dois tipos na matriz dérmica: o tipo I e o tipo III. O colágeno tipo I está localizado principalmente na derme reticular. Já o colágeno tipo III, em sua maioria, está localizado na derme papilar. Entretanto, na ferida há, ao contrário da derme íntegra, uma maior proporção de colágeno tipo III em relação ao tipo I (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Com o aumento da quantidade de fibroblastos e da produção de colágeno no local da lesão, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Na fibroplasia também há a formação do tecido de granulação, composto de macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados, suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. Este tecido é edematoso, avermelhado, e a olho nu, parece conter grânulos, embora sejam apenas as extremidades dos vasos recém-formados (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; CAMPOS, BORGES-FRANCO, GROTH, 2007; ISAAC et al., 2010).

Concomitantemente com a fibroplasia, ocorre a angiogênese. Esta fase é estimulada por diversos fatores de crescimento e é caracterizada pela migração de células endoteliais à lesão para a formação de capilares sanguíneos, essenciais para uma cicatrização adequada. Esta etapa possui essencial função no transporte de gases e nutrientes às células metabolicamente ativas durante todo o processo de reparo tecidual (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

A última etapa da fase de proliferação é a reepitelização, responsável pela reestruturação das funções epidérmicas que foram danificadas em decorrência à formação da lesão. Dessa forma, os estratos de queratinócitos presentes na primeira camada cutânea são reorganizados. Este processo envolve inúmeros fatores de crescimento e é estimulado pelo chamado efeito da vizinhança livre, fenômeno este que proporciona a migração e proliferação das células

(principalmente fibroblastos e queratinócitos), a partir da perda da interação com as células vizinhas, e assim, adquirem propriedades mitóticas latentes, movendo de uma direção a outra, através de uma “tração invisível”. A migração celular cessa pelo contato entre as células epidérmicas recém-formadas. Na ausência de lesão, as células epiteliais ficam sob o efeito do chamado efeito de inibição por contato (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

Ao final da etapa de ‘proliferação’, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está regenerada. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

A quarta etapa, penúltima do processo de cicatrização, é chamada de ‘contração da ferida’, caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas da lesão, formando uma cicatriz primária. Neste contexto, os miofibroblastos presentes na derme ligam-se às fibras de colágeno de maior espessura puxando-as em direção a eles, estimulados pelo TGF- β e PDGF. Deste modo, quanto maior o número de fibras, maior será a contração da ferida (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

Por fim, a etapa final do processo de cicatrização é a ‘remodelagem’ que envolve a deposição das fibras de colágeno na matriz extracelular, reestabelecendo a conformação tecidual de origem, embora, dependendo da profundidade da lesão, poderá haver a formação de uma cicatriz perceptível. Esta etapa é responsável pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema, reabsorção de água, diminuição da neovascularização e aumento da espessura da cicatriz (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ISAAC et al., 2010). Durante a remodelagem ocorre a diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, além de perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz (ISAAC et al., 2010). O número de células diminui, mas aumenta a síntese e produção de colágeno do tipo I. Com a evolução do processo,

acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células (tanto inflamatórias, quanto proliferativas) desaparecem, sendo observada apoptose de fibroblastos e células endoteliais (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Embora todas as 5 etapas do processo de cicatrização sejam didaticamente apresentadas separadamente em uma sequência lógica, a reparação tecidual é dinâmica e possui todas as fases interdependentes, que ocorrem maneira simultânea, envolvendo fenômenos fisiológicos, bioquímicos e celulares (ISAAC et al., 2010), conforme apresentadas na **Figura 3**.

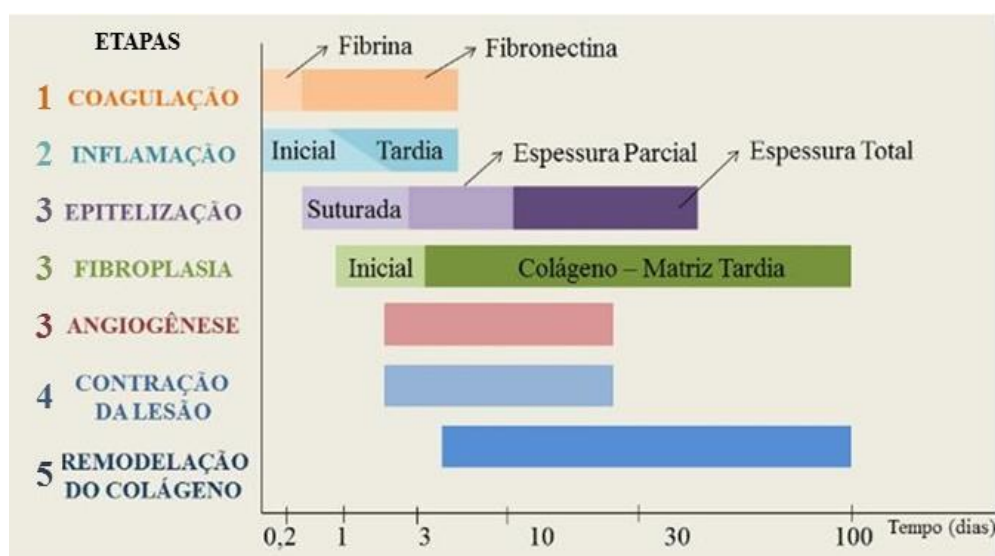


Figura 3. Representação gráfica da sobreposição das 5 fases do processo de cicatrização (ISAAC et al., 2010)

A partir da **Figura 3** é possível verificar que o processo de coagulação é iniciado imediatamente após a formação da ferida, juntamente com o processo inflamatório agudo, com o envio de monócitos, macrófagos e neutrófilos ao local do ferimento. No 2º dia, há a migração de anticorpos e linfócitos T e B. O processo inflamatório é encerrado após, aproximadamente, 7 dias, com a redução dos mediadores e células inflamatórias. Os processos de proliferação e contração da ferida são iniciados no 1º e 2º dias, respectivamente. Dependendo da profundidade e extensão da lesão o amadurecimento do colágeno recém-sintetizado pelos fibroblastos presentes na derme, pode começar no 5º dia, podendo estender-se até 100 dias após a formação da lesão.

A cura de uma ferida está diretamente relacionada a diversos fatores que influenciam o processo de cicatrização, podendo ser locais, envolvendo condições intrínsecas à lesão, como eritemas, edemas, hematomas, infecções locais, presença de corpos estranhos ou tecido necrótico, e ressecamento da ferida; ou sistêmicos, que envolvem a idade do indivíduo, estado nutricional, doenças crônicas, tabagismo, etilismo, alterações circulatórias e de coagulação (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; CAMPOS, BORGES-FRANCO, GROTH, 2007; ISAAC et al., 2010; OLIVEIRA, DIAS, 2012).

Durante o processo de reparo tecidual, é necessário manter a ferida livre de micro-organismos, pois a presença destes impede que o processo de cicatrização seja concluído. Deve-se evitar trauma mecânico ou químico e preservar especialmente o tecido de granulação. É indicado realizar a limpeza dos ferimentos sempre com solução fisiológica 0,9%, por ser estéril, segura, pronta para uso e de fácil aquisição. Após a limpeza, é necessário utilizar um curativo, capaz de impedir condições de traumas físicos e químicos. Dentre os curativos disponíveis no mercado farmacêutico, destacam-se aqueles contendo ácidos graxos essenciais, hidrocolóides, alginato de sódio, carvão ativado e sulfadiazina de prata (OLIVEIRA, DIAS, 2012).

Dependendo do grau da lesão, pode ser necessário realizar o desbridamento da ferida, ou seja, remover tecidos necróticos, exsudatos, fragmentos, bactérias e resíduos, através de quatro métodos: cirúrgico, autolítico (curativos contendo hidrogéis, hidrocolóides e alginatos), mecânico (utilizando gazes e lavagens a jato de solução fisiológica 0,9%) ou enzimático (medicamentos tópicos contendo colagenase, papaína ou uroquinase) (OLIVEIRA, DIAS, 2012).

4. Sistemas nanoemulsionados

Durante muito tempo, a pele era considerada uma barreira impermeável, entretanto, este conceito foi aos poucos sendo modificado e, atualmente, são reconhecidos diferentes graus de permeabilidade cutânea (PRISTA, ALVEZ, MORGADO, 2003). As nanoemulsões são consideradas uma interessante

alternativa para a administração tópica de diferentes tipos de fármacos e biomoléculas. Estes sistemas são definidos como dispersões nanométricas de gotículas oleosas contidas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. São caracterizados como sistemas líquidos, de baixa viscosidade, aspecto leitoso e tamanho de gotícula inferior a 1 μm , embora na área farmacêutica, aceitam-se gotículas entre 50 e 500 nm. As nanoemulsões apresentam também características sensoriais agradáveis, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, além de facilitar a penetração de ativos pela estrutura cutânea (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004; TADROS et al., 2004).

Neste tipo de sistema, as moléculas veiculadas estão preferencialmente dispersas e/ou adsorvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura, que corresponde de 5-30% da composição da formulação, e vem atraído a atenção nos últimos anos como uma forma farmacêutica promissora e vantajosa para a incorporação de fármacos com baixa solubilidade em meio aquoso (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004; TADROS et al., 2004; GUTIÉRRIEZ et al., 2008). Devido ao reduzido diâmetro de gotícula, este sistema permite a formação de um sistema de depósito uniforme de ativos sobre pele, promovendo assim, o aumento da permeação transdérmica (SILVA et al., 2009; KHURANA, JAIN, BEDI, 2013). Segundo Alves e colaboradores (2007) e Sakulku e colaboradores (2009), nanoemulsões que visam aplicação cutânea devem apresentar tamanho de gotícula entre 100-300 nm.

Na literatura são encontrados diversos estudos que empregam nanoemulsões pela via tópica. Nestes trabalhos, os pesquisadores incorporaram óleos vegetais e/ou fármacos no núcleo oleoso destes sistemas, e verificaram efeitos terapêuticos superiores a administração convencional, reduzindo consideravelmente os efeitos adversos dos compostos. Faiyazuddina e colaboradores (2009) nanoemulsionaram o óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e verificaram um efeito anti-acne superior ao tratamento padrão com clindamicina. Sakulku e colaboradores (2009) observaram um potente efeito repelente contra mosquitos *Aedes aegypti* de nanoemulsões contendo óleo

de citronela (*Cymbopogon nardus*). Já Dolgachev e colaboradores (2016) e Fan e colaboradores (2016) verificaram efeito antimicrobiano de nanoemulsões contendo o composto NB-201 em queimaduras, melhorando o processo de cicatrização.

Óleos de origem vegetal e semi-sintéticos são amplamente empregados no desenvolvimento de nanoemulsões com interesse terapêutico. Sob o ponto de vista tecnológico, óleos contendo triglicerídeos de cadeia média (TCM), caracterizados quimicamente como ésteres de três ácidos graxos, com 8 a 12 átomos de carbono, unidos a uma molécula de glicerol, são os mais empregados para compor a fase interna de nanoemulsões, devido à alta capacidade de solubilização de compostos lipossolúveis (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2014; PRIMO et al., 2006).

Outro fator de extrema importância no desenvolvimento de um sistema nanoemulsionado é a escolha do tensoativo (OLIVEIRA, 2008). Preferencialmente escolhem-se tensoativos hidrossolúveis para a estabilização da interface óleo/água (O/A), visto que o conteúdo aquoso apresenta maior quantidade na formulação (KOMMURU et al., 2001). Entretanto, para uma melhor estabilidade do sistema, são empregados misturas de tensoativos lipo/hidrofílicos para melhor equilíbrio de ambas as fases. A utilização de tensoativos não-iônicos, como o Span[®] (ésteres de sorbitano) e o Tween[®] (ésteres de sorbitano polietoxilados), prevalecem aos tensoativos aniônicos (éter sulfatos de alquila e alquil sulfosuccinatos) e catiônicos (quaternários de amônio) por produzirem emulsões mais estáveis e menos tóxicas que a maioria dos tensoativos iônicos (ACOSTA, 2008).

O método de preparação de nanoemulsões é determinante para a definição de suas propriedades físico-químicas e do diâmetro das gotículas. Atualmente há vários métodos de produção descritos na literatura, do qual destaca-se a homogeneização a alta pressão. Este método físico é capaz de obter nanoemulsões monodispersas com reduzido diâmetro de gotícula, tanto em escala industrial quanto laboratorial, embora em algumas condições experimentais, causam aquecimento da amostra e requerem o emprego de equipamentos específicos (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

A homogeneização a alta pressão é um método baseado na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento (ALMEIDA, TEIXEIRA,

KOESTER, 2008). A preparação por esta técnica ocorre geralmente em duas etapas. Primeiramente, as fases aquosa e oleosa são preparadas separadamente (podendo ou não serem aquecidas) e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade, obtendo uma emulsão grosseira com um tamanho de gotícula micrométrico. Em uma segunda etapa, o diâmetro de gotícula da emulsão primária é progressivamente reduzido até valores nanométricos, compreendidos entre 100 a 300 nm, através da utilização de homogeneizadores à alta pressão (BIVAS-BENITA et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Após o preparo de qualquer emulsão, estas podem sofrer alterações que dependem do tempo e da temperatura de armazenamento, podendo levar a instabilidade do sistema, evidenciada pelos fenômenos de cremagem, floculação e/ou coalescência (PRISTA, ALVEZ, MORGADO, 2003). A cremação ocorre quando as gotículas tendem a subir para a superfície ou sedimentar na fase externa da formulação, devido a grande diferença de densidade das fases. A floculação acontece quando gotículas menores se unem a gotículas maiores, em formato de flocos. Já a coalescência é um fenômeno irreversível que ocorre quando há união de gotículas e há a ruptura da interface dos tensoativos, formando gotículas maiores, resultando na separação total das fases (ALLEN JR, POPVICH, ANSEL, 2013). Por serem termodinamicamente instáveis, o tamanho das gotículas tende a aumentar com o tempo até coalescer o sistema. Contudo, para manter o tamanho nanométrico das gotículas, é necessário utilizar tensoativos adequados, a fim de contribuir para a estabilização estérica entre as gotículas, reduzindo, assim, a possibilidade de coalescência e aumentando a estabilidade do sistema (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004).

Dessa forma, três características físico-químicas devem ser analisadas: o tamanho das gotículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. O primeiro é um indicativo de estabilidade, visto que o aumento do tamanho médio das gotículas pode revelar fenômenos de floculação e/ou coalescência (ROLAND et al., 2003; CAMARGO, 2008). A técnica mais utilizada para analisar este parâmetro é por espalhamento de luz dinâmico e técnicas complementares têm

sido empregadas para indicar a morfologia, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET) (ALVES et al., 2007).

O índice de polidispersão (PDI) indica a distribuição das gotículas no sistema. Este parâmetro é analisado concomitante com o diâmetro médio, por meio de um equipamento de espalhamento de luz dinâmico. Valores de PDI inferiores a 0,3 são desejados, pois demonstram boa homogeneidade (ALVES et al., 2007; VARGAS, 2010).

A superfície das gotículas apresenta uma carga elétrica, devido aos componentes presentes no sistema, denominado potencial zeta. Este está diretamente relacionado à repulsão eletrostática superficial entre as gotículas dispersas (ROLAND et al., 2003). Esse parâmetro é consequência da natureza química das moléculas localizadas na interface das fases, frequentemente originado pela dissociação de grupamentos químicos dos agentes tensoativos (NETZ, ORTEGA, 2002). Um elevado valor de potencial zeta, em módulo ($> \pm 30$ mV), é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis fenômenos de floculação e coalescência do sistema (ROLAND et al., 2003).

5. Hidrogéis

Os hidrogéis são redes macromoleculares tridimensionais de polímeros hidrofílicos que entumecem em contato com soluções aquosas e adquirem a forma de gel, podendo absorver até centenas de vezes a sua massa em água (PEPPAS et al., 2009). São classificados em dois grandes grupos: físicos (reversíveis) ou químicos (irreversíveis). Os hidrogéis físicos (**Figura 4a**) são caracterizados quando as redes formadas pelos polímeros são unidas por *clusters* (emaranhado de fibras poliméricas) e por forças coesivas, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Neste caso, a rede polimérica é desorganizada e as moléculas de água devem atravessar o *cluster* molecular para adquirir a forma semi-sólida (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008; PEPPAS et al., 2009). As interações físicas são reversíveis e podem ser rompidas por mudanças em certas condições, como força iônica, pH, temperatura e aplicação de tensão de

cisalhamento. Já os hidrogéis químicos (**Figura 4b**) são caracterizados quando a rede polimérica é unida ordenadamente por ligações covalentes através de reações químicas, aplicação de radiação sobre as fibras, ou por conversão de polímeros hidrofóbicos em polímeros hidrofílicos (HOFFMAN, 2002; HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008). A rede polimérica é organizada e as moléculas de água têm acesso facilitado às fibras. As interações químicas são irreversíveis, isto é, devido à alta complexidade das reações químicas envolvidas, os produtos formados não podem voltar ao estado original (HOFFMAN, 2002).

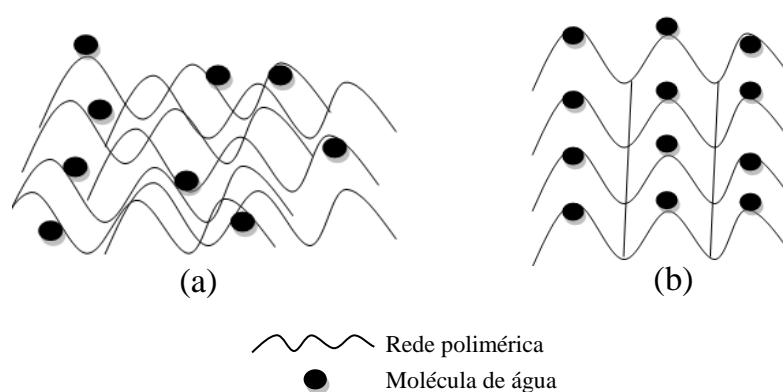


Figura 4. Rede polimérica de hidrogéis físicos (a) e químicos (b)

Os hidrogéis são considerados biocompatíveis devido à sua alta similaridade com os tecidos do corpo, já que possuem alto conteúdo de água (PEPPAS et al., 2009). Uma ampla gama de composições poliméricas tem sido utilizada na produção de hidrogéis, as quais podem ser classificadas de acordo como a natureza iônica (aniônicos, catiônicos, anfifílicos e não iônicos) dos polímeros (HOFFMAN, 2002; HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008), conforme apresentado na **Tabela 2**.

Os hidrogéis foram os primeiros biomateriais desenvolvidos para uso no corpo humano. Na década de 50 começaram a ser realizadas pesquisas promissoras envolvendo hidrogéis para fins terapêuticos. Em 1953, os pesquisadores Wichterle e Lim, sintetizaram os primeiros géis biocompatíveis de PHEMA[®], quimicamente denominados poli(2-hidroxietilmetacrilato) (WICHTERLE, LÍM, 1960). Já em 1989, Yannas e colaboradores (1989) recobriram as feridas de pacientes com queimaduras com hidrogéis de polímeros

naturais (colágeno e cartilagem de tubarão), verificando efeito positivo no processo de cicatrização. No mesmo ano, Rosiak, Rucinska-Rybus e Pekala (1989) verificaram que o uso de curativos contendo hidrogéis em feridas era benéfico no processo de restauração da pele.

A partir de então, diversos estudos revelaram importantes aplicações destes sistemas no encapsulamento de microeletrônicos, visando o uso como sensores; liberação controlada de fármacos, proteínas e células; membranas bioseparadoras; removedores de íons pesados; entre outros (HOFFMAN, 2002).

Tabela 2. Polímeros hidrofílicos utilizados na produção de hidrogéis

Natureza do Polímero	Exemplos
Aniônico	Polímeros carboxivinílicos (carbômeros), alginato, carragenina e sulfato de condroitina
Catiônico	Quitosana e polilisina
Anfífilico	Gelatina, carboximetilquitina e fibrina
Não iônico (Neutro)	Derivados de celulose, agarose e dextrano
Poliésteres sintéticos	PEG-PLA, PEG-PLGA, PEG-PCL*

*: **PEG**: polietilenoglicol; **PLA**: ácido polilático; **PLGA**: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico); **PCL**: policaprolactona.

O emprego de hidrogéis na área farmacêutica tem sido uma interessante escolha para a administração tópica de ativos, uma vez que apresentam um elevado teor de água, serem facilmente lavável, e não apresentarem aspecto gorduroso sobre a pele, promovendo, assim, uma maior aceitação pelo paciente (CORRÊA et al., 2005). Além disso, formulações de uso tópico contendo um sistema nanoemulsionado não devem apresentar maior afinidade pelo veículo do que pela pele. Dessa forma, a incorporação em uma base hidrofílica tende a eliminar esse problema aumentando, também, a liberação dos componentes contidos na matriz do hidrogel (ALVES et al., 2007; BABOOTA et al., 2007; MOU et al., 2008).

6. Referências

ABBAS, M. A.; TAHA, M. O.; ZIHLIF, M. A.; DISI, A. M. β -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**, n.702, p.12-19, 2013.

ACOSTA, E. J. The HLD-NAC equation of state for microemulsions formulated with nonionic alcohol ethoxylate and alkylphenol ethoxylate surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.320, n.1-3, p.193-204, 2008.

ALBANESI, C.; PASTORE, S. Pathobiology of chronic inflammatory skin diseases: Interplay between keratinocytes and immune cells as a target for anti-inflammatory drugs. **Current Drug Metabolism**, v.11, p. 210-227, 2010.

ALLEN JR, L. V.; POPVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9^a.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716p.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p.780-788, 2008.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.341, p.215-220, 2007.

AMIEL, E.; OFIR, R.; DUDAI, N.; SOLOWAY, E.; RABINSKY, T.; RACHMILEVITCH, S. β -Caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of gilead (*Commiphora gileadensis*) is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-8, 2012.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design development and evaluation of novel nanoemulsions formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v.8, p.315-332, 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.10, p.1823-1833, 2012.

BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMELJN, S.; MEIJGAARDEN, K. V.; KOERTEN, H.; MEULEN, H. V. D.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; HANS J.; GERRIT, B. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **Journal of Controlled Release**, v.100, p.145-155, 2004.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.156-165, 2012.

BRINK, H. E.; STALLING, S. S.; NICOLL, S. B. Influence of serum on adult and fetal dermal fibroblast migration, adhesion, and collagen expression. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.41, p.252-257, 2005.

BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v.12, n.1, p.28-32, 1998.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, s.7, p.1eS-32eS, 2006.

CALIXTO, J. B. Resenha: *Cordia verbenacea*. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, n.2, p.5-8, 2005.

CAMARGO, M. F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica**. 119p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil, 2008.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuna* Hayne. **Phytochemistry**, v.55, p.773-778, 2000.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v.141, p.277-299, 2010.

CHAIIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, n.21, p.501-506, 2007.

CHO, J. Y.; CHANG, H. J.; LEE, S. K.; KIM, H. J.; HWANG, J. K.; CHUN, H. S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Science**, v.80, p.932-939, 2007.

CORRÊA, N. M.; JÚNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F.; RICCI, G.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.73-78, 2005.

CROSERÀ, M.; BIVENZI, M.; MAINA, G. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of literature. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.82, p.1043-1055, 2009.

CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J. F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R. M.; HAYES, M. T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with picosirius-polarization. **Wound Repair and Regeneration**, v.12, n.3, p.374-383, 2004.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v.699, p.23-28, 2010.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; KOESTER, L. S. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops & Products**, v.59, p.154-162, 2014.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p.79-84, 2012.

DOLGACHEV, V. A.; CIOTTI, S. M.; EISMA, R.; GRACON, S.; WILKINSON, J. E.; BAKER, J. R.; HEMMILA, M. R. Nanoemulsion therapy for burn wounds is effective a topical antimicrobial against gram-negative and gram-positive bacteria. **Journal of Burn Care of Research**, v.37, n.2, p.e104-e114, 2016.

FAIYAZUDDINA, M.; BABOOTA, S.; ALI, J.; AHUJA, A.; AHMAD, S. Characterization and *in vitro* bioactive studies of lemongrass oil phytonanoemulsion system in the treatment of acne vulgaris. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v.3, n.1, p.13-21, 2009.

FAN, Y.; CIOTTI, S. M.; CAO, Z.; EISMA, R.; BAKER, J.; WANG, S. H. Screening of nanoemulsion formulations and identification of NB-201 as an

effective topical antimicrobial for *Staphylococcus aureus* in a mouse model of infected wounds. **Military Medicine**, v.81, s.81, p.259-64, 2016.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, p.228-236, 2007.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J; KÜHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.251, p.53-54, 2004.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.558-66, 2004.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; MAFFEI-FACINO, R. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.440, n.2, p.170-178, 2013.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Science**, n.105, p.9099-9104, 2008.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; CESARE-MANNELLI, L. D; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **Farmaco**, v.56, n.5, p.387-389, 2001.

GOGIA, P. P. **Feridas: Tratamento e Cicatrização**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 192p.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, n.109, p.486-492, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLE, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.13, p.245-251, 2008.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.1638-1649, 2008.

HARRIS, M. I. N. **Pele: Estrutura, Propriedades e Envelhecimento**. São Paulo: Senac, 2003.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.43, p.3-12, 2002.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: Cicatrização fisiológica. **Revista Médica da Universidade de São Paulo**, v.89, n.4, p.125-131, 2010.

JUN, N. J.; MOSADDIK, A.; MOON, J. Y.; JANG, K. C.; LEE, D. S.; AHN, K. S.; CHO, S. K. Cytotoxic activity of β -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. **Records of Natural Products**, v.5, n.3, p.242-246, 2011.

KADUNC, B. V.; PALERMO, E.; ADDOR, F. A.; METSAVAHT, L. O.; MATTOS, R.; BERRERA, S. M. C. **Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiaatria e laser**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 944p.

KOMMURU, T. R.; GURLEY, B.; KHAN, M. A.; REDDY, I. K. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: Formulation development and bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.212, p.233-246, 2001.

KUBO, I.; CHAUDHURI, S. K.; KUBO, Y.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v.62, n.5, p.427-430, 1996.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.12, p.1643-1647, 2007.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; TINTINO, S. R.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.4, p.522-528, 2013.

LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, H. P.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, n.142, p.274-282, 2012.

LIN, C. L.; SURI, R. M.; RAHDON, R. A.; AUSTYN, J. M.; ROAKE, J. A. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. **European Journal of Immunology**, v.28, n.12, p.4114-4122, 1998.

LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada em hidrogéis**. 74p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013.

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DIAS, D. O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.104, p.144-148, 2015.

MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares. **Revista Educação Médica Continuada**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MARTIN, S.; PADILLA, E.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. **Planta Medica**, n.59, p.533-536, 1993.

MASON, T. G., WILKING, J. K., MELESON, K. Nanoemulsions: Formation, structure and physical properties. **Journal of Physics**, v.635, n.18, p.635-666, 2006.

MENEGHIN, P.; VATTIMO, M. F. F. Fisiopatologia do processo cicatricial. In: JORGE, A. S.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. 348p.

MICHALANY, J.; MICHALANY, N. S. **Anatomia e Histologia da Pele**. São Paulo: Lemos, 2002. 71p.

MICHELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. **Bioresource Technology**, n.100, p.6615-6623, 2009.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v.56, n.9, p.907-916, 2011.

MORETTO, P.; SURLEVE-BAZEILLE, J. E.; LICU, D.; MICHELET, C.; STOEDZEL, P. Microanalysis of the human skin structure: Preliminary results. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v.158, n.4, p.386-392, 1999.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.353, p.270-276, 2008.

MOURA-ESTEVIÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.406-412, 2009.

MUSTOE, T. A.; OÍSHAUGHNESSY, K.; KLOETERS, O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, s.7, p.35S-41S, 2006.

NATÉRCIA, F. Parcerias e inovação impulsionam setor farmacêutico. **Inovação UNIEMP**, v.1, n.3, p.32-37, 2005.

NETTINA S. M. **Prática de Enfermagem**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 1856p.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química: Uma Abordagem Conceitual para as Ciências Farmacêuticas**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 299p.

NOGUEIRA, E. O.; NOVAES, A. S. M.; SANCHEZ, C. M. S.; ANDRADE, C. M.; SILVA, M. F. A. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, n.4, p.293-300, 2012.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleo de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 128p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil, 2008.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Wound healing: Stages and influencing factors. **Acta Veterinária Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

PAIVA, L. A. F.; ALENCAR-CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Investigation on the wound healing activity of

oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, n.8, p.737-739, 2002.

PASE, P. F.; DUARTE, D. W.; SCHUCH, A. E. H.; CRESTANI, T. A.; WEBER, E. S. Estudo epidemiológico de pacientes ambulatoriais da unidade de queimados do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.11, n.3, p.155-215, 2012.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; GAMA, V. S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E. L. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v.21, n.3, p.356-362, 2014.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAEA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.27-46, 2009.

PERINI, J. A.; ANGELI-GAMBA, T.; ALESSANDRA-PERINI, J.; FERREIRA, L. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. Topical application of Acheflan[®] on rat skin injury accelerates wound healing: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.203, p.1-8, 2015.

POLITEO, O.; JUKI, J.; MILO, M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. **Croatia Chemica Acta**, n.79, p.545-552, 2006.

PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan[®]: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.311, p.354-357, 2006.

PRISTA, L. N.; ALVEZ, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6ed. Vol.I. Lisboa: Fundação Lacouste Gulbenkian, 2003. 786p.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.470-491, 2011.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS Editora/Editora da UFSC, p.45-74, 2004.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 442p.

RODRIGUES, F. G.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, F. F.; SARAIVA, M. E.; ALMEIDA, S. C. X.; CABRAL, M. E. S.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v.4, n.3, p.161-165, 2012.

ROLAND, I.; PIEL, G., DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.263, p.85-94, 2003.

ROSIK, J.; RUCINSKA-RYBUS, A.; PEKALA, W. **Method of Manufacturing Hydrogel Dressings**. EUA nº US4871490A, 30 dez. 1987, 03 out. 1989.

RUSSO, E. B.; TAMING, T. H. C. Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v.163, n.7, p.1344-1364, 2011.

SABULAL, B.; DAN, M.; JOHN, A. J.; KURUP, R.; PRADEEP, N. S.; VALSAMMA, R. K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, n.67, p.2469-2473, 2006.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPA-TKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAIU, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.372, p.105-111, 2009.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. **Pharmaceutical Science Technology**, v.8, n.4, p.91-98, 2007.

SILVA, A. P. C.; NUNES, B. R.; OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v.64, p.32-35, 2009.

SILVA, K. A. B. S.; PASZCZUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α , β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v.152, p.1872-1887, 2011.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A. T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical β -caryophyllene: Air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.4, p.538-545, 2006.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. D. S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans-caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba Oil (*Copaifera* sp.). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

SOARES, M.; VITORINO, C.; SOUSA, J.; PAIS, A. Permeação cutânea: Desafios e oportunidades. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.3, p.337-348, 2015.

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana**. 23.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 840p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Crianças e Adolescentes Seguros**: Guia Completo para Prevenção de Acidentes e Violências. São Paulo: Publifolha, 2005. 333p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS. **Queimaduras**: Conceitos e Causas. Disponível em: <http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-conceito-e-causas>. Acesso em: 22 nov. 2016.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.20, p.145-149, 2004.

SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. Anatomia, Fisiologia e Histologia da Pele. In: KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 1282p.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108, p.303-318, 2004.

VALACCHI, G.; ZANARDI, I.; STICOZZI, C.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V. Emerging topics in cutaneous wound repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1259, n.1, p.136-144, 2012.

VARGAS, B. A. **Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína: Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína**. 103p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata*

Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, n.112, p.248–254, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

VIEIRA, R. C., BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J. J.; LINO-JÚNIOR, R. S.; BRITO, L. A. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.358-366, 2008.

WEINSTEIN, G. D.; BOUCEK, R. J. Collagen and elastin of human dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.35, p.227-229, 2003.

WICHTERLE, O.; LÍM, D. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v.185, p.117-118, 1960.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick**: Tratado de Dermatologia. 7ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p.88-259, 2011.

YANG, C. H.; HUANG, Y. C.; TSAI, M. L.; CHENG, C. Y.; LIU, L. L.; YEN, Y. W.; CHEN, W. L. Inhibition of melanogenesis by β -caryophyllene from lime mint essential oil in mouse B16 melanoma cells. **International Journal of Cosmetic Science**, v.37, n.5, p.1-5, 2015.

YANNAS, I. V.; LEE, E.; ORGILL, D. P.; SKRABUT, E. M.; MURPH, G. F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, n.3, p.933-937, 1989.

ZHU, W.; GUO, C.; YU, A.; GAO, Y.; CAO, F.; ZHAI, G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.378, p.152–158, 2009.

PARTE EXPERIMENTAL

Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo
 β -cariofileno nanoemulsionado

*O texto completo da **Parte Experimental**, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 69 a 110, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para a publicação em periódico científico. O artigo apresenta os resultados da produção e caracterização de uma nanoemulsão e hidrogel derivado contendo β -cariofileno. Também são apresentados o estudo de permeação/retenção cutânea, perfil de liberação, e a atividade cicatrizante in vivo do marcador presente nas formulações.*

O β -cariofileno adquirido comercialmente neste estudo apresentou-se líquido, transparente, brilhante, homogêneo e com notas olfativas amadeiradas. Os valores da densidade relativa, índice de refração, viscosidade e teor, obtidos experimentalmente, enquadraram-se às especificações descritas no laudo do produto enviado pelo fornecedor, comprovando, dessa forma, a qualidade da matéria-prima adquirida. Por meio do método de *Kovats*, foi possível realizar a identificação dos compostos presentes na amostra, empregando CG/MS (KOVATS, 1958; VAN DEL DOOL, KRATS, 1963), confirmado como composto majoritário (83,0%), com teor superior ao descrito no rótulo da embalagem (< 80,0%). Foram encontrados também traços de outros compostos, inclusive o α -cariofileno (α -humuleno), isômero do β -cariofileno. A presença desse é decorrente da dificuldade analítica na separação de isômeros frente a análises cromatográficas, devido à semelhança estrutural das moléculas (PORTE, PORTE, OLIVEIRA, 2014).

A nanoemulsão contendo β -cariofileno produzida neste trabalho foi baseada em um estudo de otimização (fatorial *Box-Behnken*) proposto por Dias e colaboradores (2014), empregando óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). Apesar da formulação ideal apresentada pelos pesquisadores apresentar em sua composição óleo TCM, este é conhecido como promotor de reparo cutâneo, o que conduziria a um viés na avaliação da atividade cicatrizante do β -cariofileno. Dessa forma, optou-se em utilizar a formulação que apresentou a maior estabilidade e teor de β -cariofileno na ausência do óleo fixo. Devido à baixa viscosidade dos sistemas nanoemulsionados foi necessário espessar as nanoemulsões com um polímero de natureza não iônica. Os hidrogéis vêm sendo utilizados devido ao elevado teor de água presente no meio, serem facilmente laváveis, e não apresentar aspecto gorduroso na pele, promovendo assim, uma maior aceitação dos pacientes (CORRÊA et al., 2005), além de aumentar a liberação dos componentes contidos na matriz do hidrogel sobre a superfície cutânea (ALVES et al., 2007; BABOOTA et al., 2007; MOU et al., 2008).

As nanoemulsões contendo β -cariofileno e as mesmas espessadas em hidrogel, apresentaram-se estáveis sob refrigeração ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), durante 60 dias.

Foram encontradas diferenças significativas entre as formulações em relação ao potencial zeta, devido ao ajuste do pH, e ao teor, por meio da diminuição da volatilização das moléculas de β -cariofileno aderidas na interface da rede polimérica (PAINES et al., 2015).

O estudo de permeação/retenção cutânea *in vitro* verificou que o β -cariofileno isolado, quando aplicado na pele íntegra, ficou retido apenas na camada cutânea mais externa (estrato córneo). Quando este mesmo composto foi nanoemulsionado, e posteriormente espessado em hidrogel, foi possível observar uma maior retenção no composto em camadas mais profundas (epiderme e derme). Ao remover o estrato córneo, simulando uma ferida superficial, foi possível verificar uma retenção maior de β -cariofileno nas camadas cutâneas, inclusive da versão isoalada. Dessa forma, é possível afirmar que o estrato córneo é uma grande barreira para permeação de substâncias aplicadas topicamente (HADGRAFT, 2004; HADGRAFT, LANE, 2005). Ao remover o estrato córneo e a epiderme, simulou-se uma ferida profunda. Nesta condição, diferentemente das anteriores, não foram observadas diferenças significativas na concentração de β -cariofileno retido no tecido dérmico, independente da forma de entrega do composto (livre, nanoemulsionado e espessado em hidrogel), indicando uma condição de saturação dérmica do composto pelas células.

O estudo de liberação *in vitro* verificou que a dose aplicada de β -cariofileno isolado, liberada pela membrana de éster de celulose, foi de $98,16 \pm 1,96\%$, enquanto na forma nanoemulsionada, apresentou uma liberação, após 8 horas, de $82,31 \pm 1,41\%$, e quando espessada em hidrogel, apresentou $68,08 \pm 2,28\%$. Dessa forma, destaca-se a influência das fibras poliméricas na liberação do composto na formulação espessada com hidrogel, embora, em ambas as formulações, o perfil de liberação foi bastante semelhante até a 7ª hora do experimento.

Ao final, o estudo da atividade cicatrizante *in vivo* revelou que o β -cariofileno isolado, o mesmo nanoemulsionado, e posteriormente espessado em hidrogel, aceleraram o fechamento das feridas (com redução da área superficial e contração da ferida), com mecanismo possivelmente relacionado à diminuição do processo inflamatório agudo, o que pode ser observado com a redução da

concentração dos marcadores inflamatórios IL-1, TNF- α , MPO. Devido ao processo inflamatório ser integrante da etapa inicial do processo de cicatrização tecidual, a redução destes marcadores indica uma possível atividade anti-inflamatória do β -cariofileno. Os resultados indicaram que com a redução da inflamação aguda, o processo de proliferação celular iniciou-se mais rapidamente e com isso, a contração da ferida, reestabelecendo, assim, a homeostase cutânea. A análise histológica indicou que o grupo tratado com o hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado, apresentou resultados semelhantes ao grupo controle positivo (óleo Dersani[®]) se mostrando eficaz para a reparação tecidual, sendo capaz de evitar a irritação cutânea, visto com a aplicação direta do composto isolado.

Destaca-se neste trabalho, que os animais tratados com o β -cariofileno, o mesmo nanoemulsionado e, o hidrogel de β -cariofileno nanoemulsionado, demonstraram uma aceleração no processo de cicatrização, quando comparados aos grupos sem tratamento e óleo Dersani[®]. Também, o hidrogel contendo β -cariofileno nanoemulsionado mostrou-se interessante para o tratamento de feridas abertas e com risco de contaminação, sendo capaz de reduzir a irritação cutânea causada quando o β -cariofileno foi aplicado diretamente sobre as feridas.

Ao final deste estudo, foi possível observar que:

- Após os ensaios de caracterização e identificação, a amostra de β -cariofileno isolado adquirido comercialmente apresentou todas as características em conformidade com o descrito no laudo do fornecedor, confirmando assim, a qualidade da matéria-prima adquirida;

- As nanoemulsões contendo β -cariofileno e as mesmas espessadas em hidrogel permaneceram estáveis, nos parâmetros de teor, potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho de gotícula, após acompanhamento durante 60 dias, nas condições de armazenamento adequadas;

- A incorporação do β -cariofileno em nanoemulsões possibilitou uma maior permeação/retenção do ativo em pele íntegra, visto que, a versão isolada não foi capaz de atravessar o estrato córneo, uma importante barreira cutânea. Ao aplicar as formulações diretamente na derme, verificou-se a existência de uma concentração máxima de retenção, independente da formulação aplicada. O ensaio de liberação *in vitro* do β -cariofileno presente nas formulações, indicou que o composto apresentou uma cedência da forma farmacêutica maior na forma nanoemulsionada, em comparação com a versão nanoemulsionada e espessada em hidrogel;

- O β -cariofileno, o mesmo nanoemulsionado, e espesso em hidrogel, acelerou o processo de fechamento das feridas (com redução da área superficial e contração da ferida), com mecanismo possivelmente relacionado à diminuição do processo inflamatório agudo, e proteção cutânea em relação a irritação cutânea verificada com a aplicação do β -cariofileno isolado;

- Os resultados apresentados neste estudo abrem perspectivas para a realização de análises de detecção de atividade de colágeno, a fim de verificar a influência do composto nas etapas de proliferação do processo de cicatrização, assim como, análises complementares da atividade antioxidante.

ABBAS, M. A.; TAHA, M. O.; ZIHLIF, M. A.; DISI, A. M. β -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**, n.702, p.12-19, 2013.

AMIEL, E.; OFIR, R.; DUDAI, N.; SOLOWAY, E.; RABINSKY, T.; RACHMILEVITCH, S. β -Caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of gilead (*Commiphora gileadensis*) is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-8, 2012.

BABOOTA, S.; ALAM, S.; SHARMA, S.; SAHNI, J. K.; KUMAR, A.; ALI, J. Nanocarrier-based hydrogel of betamethasone dipropionate and salicylic acid for treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.1, n.3, p.139-147, 2011.

BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v.12, n.1, p.28-32, 1998.

CORRÊA, N. M.; JÚNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F.; RICCI, G.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.73-78, 2005.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v.699, p.23-28, 2010.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; KOESTER, L. S. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops & Products**, v.59, p.154-162, 2014.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p.79-84, 2012.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.291-99, 2004.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.30, p.2-12, 2005.

KADUNC, B. V.; PALERMO, E.; ADDOR, F. A.; METSAVAHT, L. O.; MATTOS, R.; BERRERA, S. M. C. **Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiaatria e laser**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 944p.

KUBO, I.; CHAUDHURI, S. K.; KUBO, Y.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v.62, n.5, p.427-430, 1996.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; TINTINO, S. R.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.4, p.522-528, 2013.

LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada em hidrogéis**. 74p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013.

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DIAS, D. O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.104, p.144-148, 2015.

PAINES, T. C.; LIMA, J. A.; WEBER, J.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B. Desenvolvimento tecnológico de hidrogéis a partir de nanoemulsão contendo clotrimazol em associação com o óleo de melaleuca. **Ciência e Natura**, v.37, p. 106-115, 2015.

PORTE, A.; PORTE, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. Chiral gas chromatography in the resolution of enantiomers involved in fruit flavours. **Química Nova**, v.37, n.10, p.1670-1679, 2014.

MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MASON, T. G., WILKING, J. K., MELESON, K. Nanoemulsions: Formation, structure and physical properties. **Journal of Physics**, v.635, n.18, p.635-666, 2006.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial

activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, n.100, p.6615-6623, 2009.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v.56, n.9, p.907-916, 2011.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.353, p.270-276, 2008.

MOURA-ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.406-412, 2009.

PAIVA, L. A. F.; ALENCAR-CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, n.8, p.737-739, 2002.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; GAMA, V. S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E. L. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v.21, n.3, p.356-362, 2014.

RODRIGUES, F. G.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, F. F.; SARAIVA, M. E.; ALMEIDA, S. C. X.; CABRAL, M. E. S.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v.4, n.3, p.161-165, 2012.

RUSSO, E. B.; TAMING, T. H. C. Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v.163, n.7, p.1344-1364, 2011.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. **Pharmaceutical Science Technology**, v.8, n.4, p.91-98, 2007.

SILVA, K. A. B. S.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene a,b-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v.152, p.1872-1887, 2011.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. D. S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans-caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba Oil (*Copaifera* sp.). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, n.112, p.248–254, 2007.

VIEIRA, R. C., BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J. J.; LINO-JÚNIOR, R. S.; BRITO, L. A. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.358-366, 2008.

ZHU, W.; GUO, C.; YU, A.; GAO, Y.; CAO, F.; ZHAI, G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.378, p.152–158, 2009.

APÊNDICE 1

Estudo de Identificação da Amostra de β -cariofileno Isolado

O Apêndice 1 aborda os resultados do estudo de identificação da amostra de β -cariofileno isolado adquirido comercialmente e utilizado neste trabalho. Foi empregado um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massas (CG/MS) para as análises, adotando um método tradicional na identificação de óleos essenciais, o Kovats.

A amostra de β -cariofileno isolado utilizada neste estudo foi adquirido comercialmente (*Sigma-Aldrich*, lote MKBV7867V, validade 24.05.2020). O teor declarado era superior a 80%, estando descrito no rótulo da embalagem e na ficha de especificação, enviados pelo fornecedor. Além dos testes de caracterização (características físicas/organolépticas, densidade relativa, viscosidade e índice de refração), descritos na **PARTE EXPERIMENTAL** desta dissertação, foi realizado um estudo de identificação da amostra de β -cariofileno por meio do método de *Kovats*.

Este método foi desenvolvido inicialmente em 1958, pelo químico sueco Ervin Kovats, o qual baseia-se na injeção de determinados hidrocarbonetos (alcanos) com quantidades crescentes de números de carbonos em sua estrutura, em um cromatógrafo gasoso (CG) sob condições isotérmicas. Os compostos eluídos são detectados e quantificados por um detector de massas (MS), e a partir de uma equação matemática, relacionam-se os tempos de retenção de cada hidrocarboneto com o tempo de retenção dos compostos de interesse presentes na amostra. O valor encontrado a partir desta equação é chamado de *Índice de Kovats* (IK). Em 1963, Van den Dool e Kratz, adaptaram a técnica proposta por Kovats, modificando as condições isotérmicas do forno de aquecimento, para um aumento gradativo da temperatura, rigorosamente controlada. A relação dos valores dos tempos de retenção dos alcanos injetados no CG, com a amostra de interesse são expressos a partir de uma outra equação matemática, chamada de *Índice de Van der Dool e Kratz* (IVDK) ou *Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura* (LTPRI). As diferenças entre as equações matemáticas empregadas para o IK e o LTPRI, estão na retirada da escala logarítmica (presente no IK) e dos tempos de retenção (ajustados no LTPRI). Embora o IK tenha sido modificado por Van den Dool e Kratz, a literatura especializada usualmente continua chamando a técnica como método de *Kovats* adaptado, expressando os valores através do LTPRI (KOVATS, 1958; VAN DER DOOL, KRATZ, 1963; MÜHLEN, 2009).

Apesar da técnica ter sido publicada no final da década de 50, é utilizada por muitos pesquisadores atualmente, considerado eficaz, seguro e seletivo na separação e identificação de compostos presentes em óleos essenciais,

empregando CG/MS (VIEGAS, BASSOLI, 2007; MÜHLEN, 2009). É importante destacar que um mesmo valor de LPTRI pode representar diversas moléculas, devido ao tempo de retenção destas substâncias serem semelhantes entre si. Dessa forma, para identificar compostos com a máxima certeza e credibilidade, o valor do LPTRI deve estar associado aos fragmentos dos íons expressos no espectro de massas. Dessa forma, para comprovar a identidade da molécula, o LPTRI e o espectro de massas devem corresponder àqueles descritos na literatura especializada, como espectrotecas, livros e compêndios (KOVATS, 1958; VIEGAS, BASSOLI, 2007; MÜHLEN, 2009).

Para a análise da amostra de β -cariofileno isolado, neste estudo foi utilizado um CG (5975C, Agilent Technologies, Califórnia, USA) acoplado a um detector de massas quadrupolo (Agilent Technologies, Califórnia, USA), com auto-amostrador (CombiPal[®], PALSystem, Zwingen, SWI), pertencente ao Laboratório de Toxicologia (LABTOXI), coordenado pela Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, do departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para este estudo foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) (30 m X 0,25 mm X 0,25 mm). A temperatura do forno de aquecimento foi programada de 60°C até 300°C com incremento de 3°C.min⁻¹, totalizando uma corrida de 80 minutos. As temperaturas do injetor e da interface foram, respectivamente, de 220°C e 300°C. Foi empregado hélio (He) (99,999% de pureza) como gás de arraste sob pressão constante de 1,0 mL.min⁻¹. Foi injetado o volume de 1 μ L de uma solução de β -cariofileno a 2% (v/v) em hexano, no modo *splitless*. No detector MS, as temperaturas do quadrupolo e da fonte de íons foram, respectivamente, de 150°C e 230°C. A energia de ionização foi de 70 eV e o software utilizado para a análise dos espectros de massas foi o *GC/MS Data Analysis Software*. Previamente foram injetados no CG/MS padrões de alcanos (C₉ a C₂₂) para calibração dos equipamentos.

Para a obtenção do LPTRI, utilizou-se a seguinte equação (VAN DER DOOL, KRATZ, 1963):

$$LPTRI = 100n \cdot 100 \frac{t_{R(a)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}}$$

Onde:

LPTRI: Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura

$t_{R(a)}$: Tempo de retenção (min) da amostra

$t_{R(n)}$: Tempo de retenção (min) do hidrocarboneto correspondente a amostra

$t_{R(n+1)}$: Tempo de retenção (min) do hidrocarboneto seguinte àquele correspondente a amostra

n : Número de carbonos do hidrocarboneto correspondente a amostra

Para a identificação dos componentes, foram comparados os LPTRI e os espectros de massas obtidos experimentalmente com o banco de dados do software *GC/MS Data Analysis Software* e com a literatura especializada (ADAMS, 2007).

O cromatograma da amostra de β -cariofileno em estudo (**Figura 1**), apresentou a formação de duas regiões bem definidas. A região **A** indicou uma faixa de tempos de retenção entre 6,0 a 7,3 minutos, enquanto a região **B**, um intervalo entre 22,6 a 25,8 minutos.

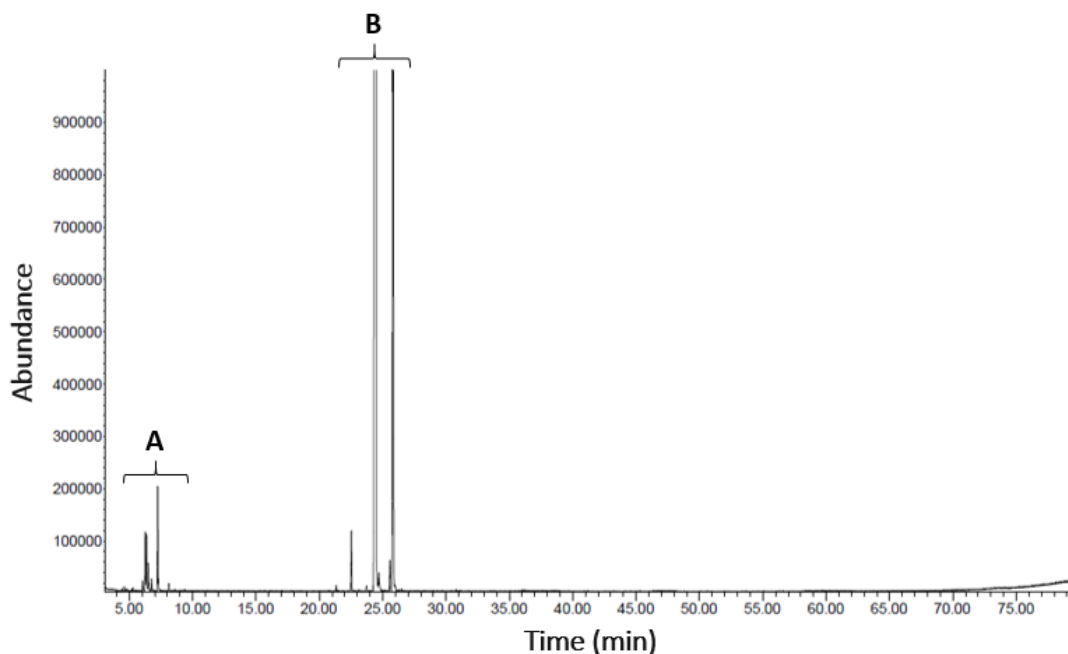


Figura 1. Cromatograma obtido em CG/MS na amostra de β -cariofileno, por meio do método de *Kovats*, após 80 minutos de corrida cromatográfica

Ampliando a região **A** do cromatograma da **Figura 1**, foi possível observar a presença de 6 picos (**Figura 2**). Estes, foram identificados através do LPTRI

calculados experimentalmente e com os respectivos espectros de massas (**Tabela 1**). Os compostos presentes nesta região apresentaram concentrações inferiores a 1,0%, e dessa forma, indicam apenas traços destes na amostra, subprodutos que não foram separados no processo de purificação para a obtenção desta fração enriquecida de β -cariofileno (VEIGA-JUNIOR et al., 2007).

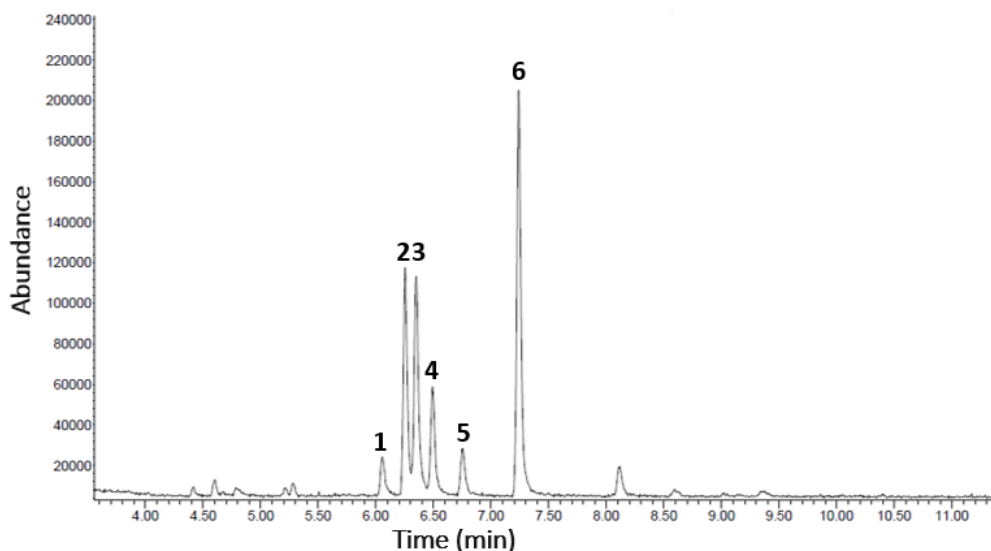


Figura 2. Cromatograma obtido em CG/MS da região A, por meio do método de Kovats

Tabela 1. Composição química da fração enriquecida de β -cariofileno obtida por CG/MS, com os respectivos nomes dos compostos, tempos de retenção, índices de retenção e concentrações

Pico	Tempo de Retenção (min)	Concentração (%)	Índice de Retenção (LPTRI)	Nome do composto
1	6,054	0,105	960	Thuja-2,4-dieno*
2	6,252	0,473	963	1,4-etil-metil-benzeno*
3	6,351	0,534	964	1,3-etil-metil-benzeno*
4	6,491	0,279	967	1,3,5-etil-metil-benzeno*
5	6,747	0,130	976	1,3,4-etil-metil-benzeno*
6	7,237	0,931	994	1,2,3-etil-metil-benzeno*
7	22,525	0,660	1375	α -ylangeno*
8	24,466	83,001	1419	β -cariofileno
9	25,568	0,390	1451	α -himanchaleno*
10	25,818	13,192	1454	α -cariofileno (α -Humuleno)

*: Contém apenas traços deste composto na amostra

Ampliando a região **B** do cromatograma apresentado na **Figura 1**, é possível observar a presença de 4 picos (**Figura 3**), identificados na **Tabela 1**. Nesta região, no pico de número 8, encontra-se o β -cariofileno na concentração de 83%. Deve-se destacar a presença de um pequeno pico (número 9) ao lado do pico número 8, ambos identificados como β -cariofileno. Neste caso, a alta temperatura prolongada (cerca de 250°C por 24 minutos), a qual a molécula esteve exposta, possibilitou a formação de um fragmento metaestável, oriundo de rearranjos moleculares. Este mesmo fragmento não é detectado nas corridas convencionais, pois a temperatura elevada não é superior a 7 minutos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005; HOFFMAN, STROOBANT, 2007).

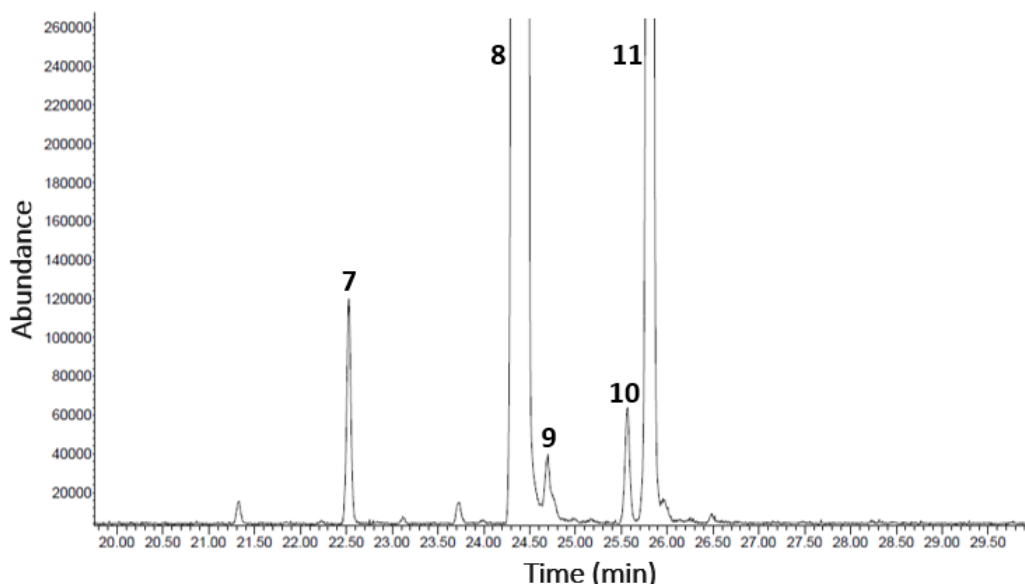


Figura 3. Cromatograma obtido em CG/MS da região **B**, por meio do método de *Kovats*

O espectro de massas do β -cariofileno é apresentado na **Figura 4**. O valor da relação m/z (massa/carga) do IM é par e pouco elevado (m/z 204) com predominância de picos ímpares, decorrente de fragmentações moleculares, o que infere a ausência de átomos de nitrogênio. O pico base (m/z 93) indica o fragmento mais abundante e estável formado no processo de ionização. Os íons m/z 204, m/z 161 e m/z 133 são qualificadores, pois representam fragmentos únicos da identidade do composto. O íon m/z 133 também é diagnóstico, responsável pela quantificação da molécula em um ensaio analítico. O padrão de fragmentação M-15, M-14 e M-13 indica perdas sucessivas de metila ($^+CH_3$) na molécula,

enquanto M-27, M-28 demonstra perdas de etileno ($^+\text{CH}=\text{CH}_2$), assim como é possível visualizar rearranjos randômicos de H^+ , com perdas sucessivas de m/z +1/-1 dos valores dos picos. Percebe-se a formação de um fragmento com m/z 66 decorrente da reação de *Retro-Diels-Alder*. Através do efeito de ressonância, pode haver a formação de um *cluster* aromático, com picos em m/z 105 (íon benzil), m/z 91 (íon tropílio), m/z 77 (cátion fenil), m/z 69, m/z 51 e m/z 39 (íon propílio).

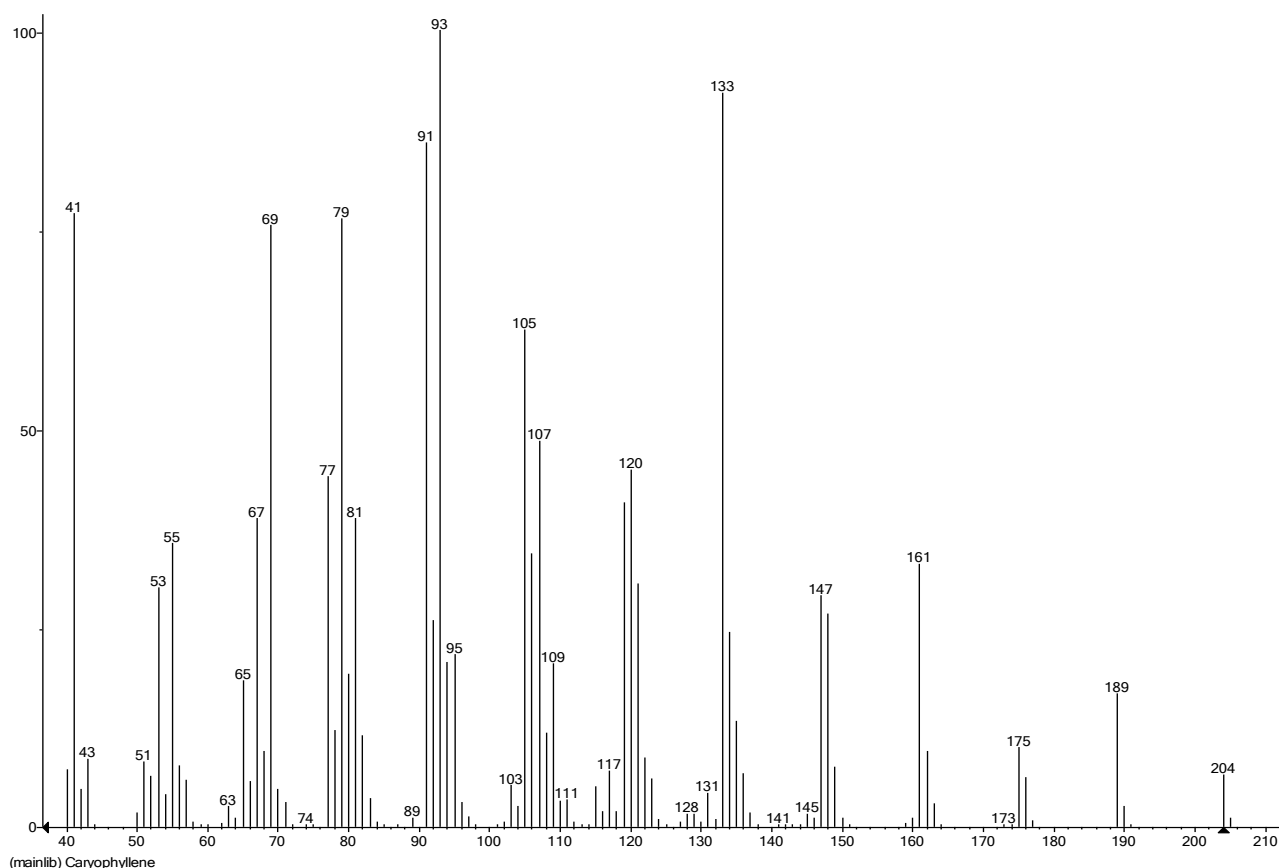


Figura 4. Espectro de massas do β -cariofileno, obtido através de CG/MS

Destaca-se ainda a presença do isômero de posição do β -cariofileno, o α -cariofileno, na concentração de 13%. É conhecida a dificuldade analítica da separação de isômeros frente a análises cromatográficas, devido à semelhança estrutural das moléculas. Neste estudo, a seletividade do método analítico e dos equipamentos utilizados, oferece grande separação entre os compostos da amostra, permitindo sua identificação.

REFERÊNCIAS:

ADAMS R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3ª. Edição, Wiley: England, 2007. 502p.

KOVATS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica Chimica Acta**, n.41, p.1915–1932, 1958.

MÜHLEN, C. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v.1, n.3, p.21-29, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Compounds Organics**. 7ª. Edição, Wiley: England, 2005. 550p.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, n.11, p.463-471, 1963.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, n.112, p.248–254, 2007.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, v.30, n.8, p.2031-2034, 2007.

O Apêndice 2 apresenta o monitoramento de alguns parâmetros de estabilidade das formulações preparadas, como tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor, a fim de verificar o comportamento das nanoemulsões contendo β -cariofileno, e da mesma espessada em hidrogel, por um período de 60 dias, armazenadas sob refrigeração.

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade da formulação manter sua identidade química, concentração, potência, qualidade, pureza e aparência física inalteráveis, em determinada matriz, durante um determinado período de tempo (BRASIL, 2005). Assim, o estudo de estabilidade é composto por três fases: de curta duração (ou acelerado), nas quais são empregadas condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de conservação; de longa duração, empregando condições de armazenamento ambientes para comprovar o prazo de validade estipulado nos testes de curta duração; e de acompanhamento, empregando condições de armazenamento ambientes a fim de verificar se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar adversamente a estabilidade do produto (CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2009).

O processo de acompanhamento da estabilidade de uma formulação é um dos métodos mais eficazes para avaliar, prever e prevenir problemas relacionados à qualidade do produto farmacêutico durante a sua validade. A segurança e a eficácia também podem ser avaliadas, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda da atividade terapêutica, ou até mesmo provocar toxicidade tecidual (SILVA et al., 2009). Embora as três fases do estudo de estabilidade sejam fundamentais nos processos de pré-formulação e controle de qualidade de produtos farmacêuticos, no presente trabalho, foi realizado apenas um estudo de acompanhamento das formulações preparadas, analisando alguns parâmetros de estabilidade, por um período determinado (60 dias).

Neste estudo, foram preparados três lotes pilotos de nanomemulsões contendo β -cariofileno e três lotes pilotos de hidrogéis contendo estas nanoemulsões, cujas composições estão apresentadas na **PARTE EXPERIMENTAL** desta dissertação. Dessa forma, acompanhou-se o tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de β -cariofileno, nos intervalos de 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a preparação das formulações,

armazenadas sob refrigeração ($6 \pm 1^\circ\text{C}$). O tamanho de gotícula e o índice de polidispersão foram medidos em triplicata por espalhamento de luz dinâmico, (Zetasizer[®] Nanoseries ZN90, Malvern Instruments, Worcestershire, RU) a uma diluição de 10 μL da amostra em 10 mL de água ultrapura. O potencial zeta foi avaliado em triplicata por espalhamento de luz eletroforético, usando o mesmo instrumento (Zetasizer[®] Nanoseries ZN90, Malvern Instruments, Worcestershire, RU), após diluição de 10 μL da amostra em 10 mL em NaCl (1 mM) filtrado a 0,45 μm . O teor de β -cariofileno em ambas formulações foi determinado conforme descrito por Lucca e colaboradores (2015).

A determinação do diâmetro de gotícula (ϕ) é uma análise fundamental não somente para a caracterização de um sistema nanoemulsionado, como também na estabilidade, cuja desestruturação é manifestada pela fusão de gotículas, levando ao fenômeno de coalescência. Em geral, nanoemulsões contendo maiores diâmetros, entre 200-500 nm, tendem a ser termodinamicamente mais estáveis (BRUXEL et al., 2012). Analisando a **Figura 1**, não foram encontradas diferenças significativas entre o tamanho médio das gotículas presentes nas formulações tanto entre os lotes, quanto no decorrer dos 60 dias de acompanhamento. O diâmetro médio encontrado foi de $277 \pm 1,87$ nm para as nanoemulsões contendo β -cariofileno, e $284 \pm 1,43$ nm para as mesmas espessadas em hidrogel. Observou-se que a presença da rede polimérica (hidroxietilcelulose), não afetou de forma significativa o tamanho das gotículas, apresentando diâmetros de gotículas muito semelhantes entre as duas formulações. Ressalta-se ainda, que a escolha e a concentração dos tensoativos Span 80[®] (lipofílico) e Tween 20[®] (hidrofílico) foram fundamentais na manutenção da tensão superficial das gotículas, evitando assim a coalescência (BRUXEL et al., 2012; DIAS et al., 2014).

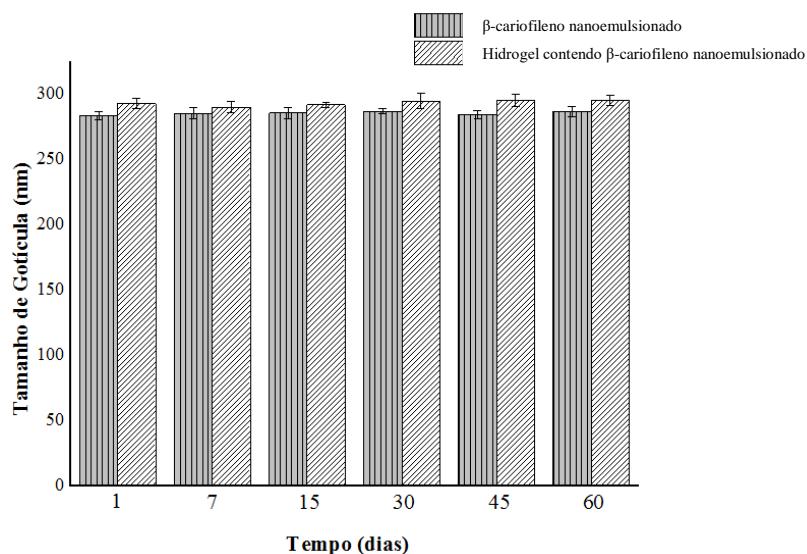


Figura 1. Acompanhamento do tamanho de gotícula das formulações contendo β-cariopheno por 60 dias

O índice de polidispersão (PDI) avalia a distribuição do tamanho das gotículas e a presença de populações com diferentes diâmetros em uma formulação. Sabe-se que populações unimodais que seguem a distribuição normal de *Gaus*, apresentam maior estabilidade, e conseqüentemente, baixos valores de PDI, quando comparados com populações bi/multimodais. Alterações nestes valores podem sugerir uma tendência à formação de agregados, precipitação ou sedimentação das gotículas que compõem o sistema (BRUXEL et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Observando a **Figura 2**, não foram encontradas diferenças significativas entre o valor do PDI nas formulações tanto entre os lotes, quanto no decorrer dos 60 dias de acompanhamento. O PDI médio encontrado foi de $0,159 \pm 0,0055$ para as nanoemulsões contendo β-cariopheno, e $0,153 \pm 0,0080$ para as mesmas espessadas em hidrogel, indicando distribuição normal do tamanho das gotículas, e uma maior estabilidade aos sistemas nanoemulsionados.

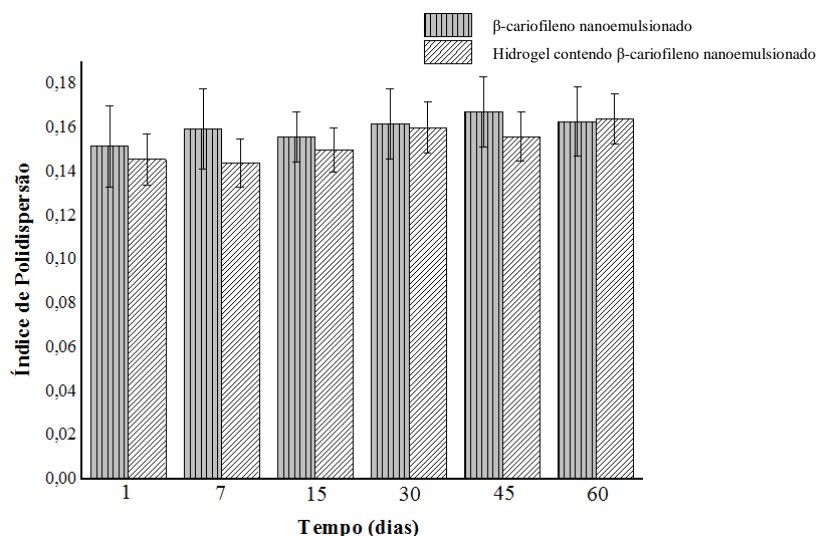


Figura 2. Acompanhamento do índice de polidispersão (PDI) das formulações contendo β-cariofileno por 60 dias

O potencial zeta (ζ) é um parâmetro que informa a carga superficial residual das gotículas em um determinado sistema, estando diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre os glóbulos dispersos, devido à presença, principalmente, dos tensoativos presentes nas formulações. Sabe-se que este potencial é pH dependente, principalmente ao grau de ionização dos componentes. A presença de óleos fixos tende a ter um efeito favorável na estabilidade do sistema, enquanto a adição de tensoativos não iônicos não afeta o potencial de superfície. O valor do potencial zeta é expresso em mV (milivolt) e quanto maior o valor (em módulo), mais afastado encontra-se da neutralidade, e assim, maior será a repulsão entre as gotículas, e conseqüentemente, maior estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012; DIAS et al., 2014).

Analisando a **Figura 3**, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores do potencial zeta nas formulações tanto entre os lotes, quanto no decorrer dos 60 dias de acompanhamento. O valor médio do potencial zeta encontrado foi de $-26,41 \pm 0,40$ mV para as nanoemulsões contendo β-cariofileno, e $-35,72 \pm 1,10$ mV para as mesmas espessadas em hidrogel, indicando repulsão entre as gotículas. O valor negativo encontrado é devido às características aniônicas do β-cariofileno (LEANDRO et al., 2012). Os tensoativos (Span 80[®] e Tween 20[®]), bem como o agente geleificante (Natrosol[®]) não apresentam influência na carga superficial das gotículas por apresentarem caráter não iônico.

Cabe ressaltar que a diferença nos valores entre as formulações era esperada. Como a nanoemulsão contendo β -cariofileno apresentou um pH mais ácido (~ 4,5), foi necessário um ajuste com NaOH 0,2 M, e esta alteração no caráter ácido-base aumentou a quantidade de ânions no sistema, e conseqüentemente, o valor do potencial zeta (SCHAFFAZICK et al., 2003; SILVA et al., 2006; SALLES et al., 2007).

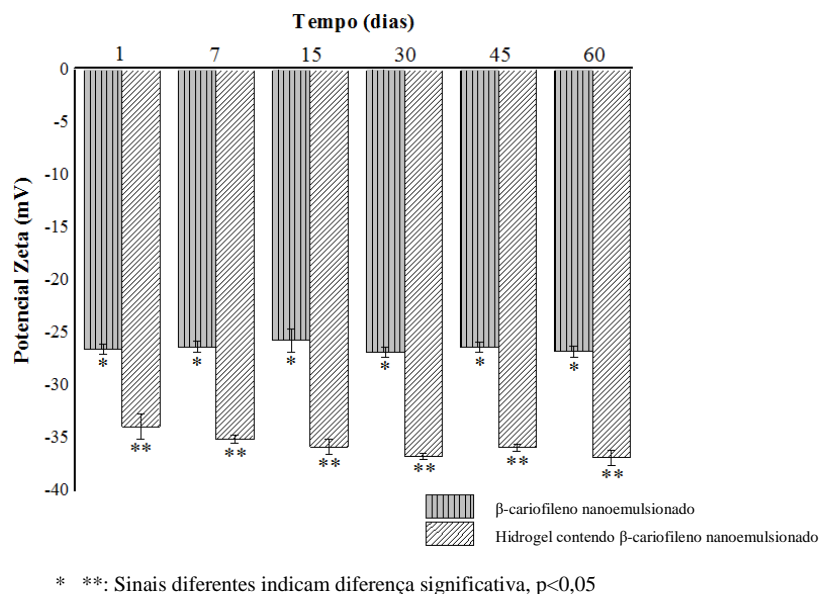


Figura 3. Acompanhamento do potencial zeta das formulações contendo β -cariofileno por 60 dias

O teor foi outro parâmetro analisado com a finalidade de analisar a quantidade de β -cariofileno presente no interior das gotículas do sistema nanoemulsionado. O acompanhamento deste indicador permite verificar a estabilidade das formulações através da evaporação ou permanência da molécula de interesse no núcleo oleoso. Empregou-se uma técnica validada para a quantificação de β -cariofileno em CG/MS, proposta por Lucca e colaboradores (2015). O núcleo oleoso presente nas nanoemulsões do estudo era composto apenas por gotículas do óleo de β -cariofileno estabilizadas por uma associação de tensoativos lipofílico e hidrofílico.

Um estudo de otimização de nanoemulsões contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Heyne), proposto por Dias e colaboradores (2014), demonstrou que formulações contendo um óleo fixo, como o TCM (triglicerídeos de cadeia média) por exemplo, no núcleo oleoso, apresentaram uma maior

quantidade de β -cariofileno no interior das gotículas. Entretanto, apesar da formulação ideal apresentar um alto teor de β -cariofileno na presença de um óleo fixo, este é promotor de cicatrização, e dessa forma, não seria capaz de verificar se tal capacidade de reparação tecidual era referente a presença do óleo fixo, ou do β -cariofileno. Assim, optou-se em utilizar a formulação descrita por Dias e colaboradores (2014) que apresentou o maior teor de β -cariofileno na ausência do óleo fixo (formulação I).

Analisando a **Figura 4**, não foram observadas diferenças significativas entre os valores dos teores tanto entre os lotes, quanto no decorrer dos 60 dias de acompanhamento. O teor encontrado de β -cariofileno logo após a preparação na nanoemulsão contendo o óleo, e na mesma espessada em hidrogel, apresentaram valores de $98,64 \pm 1,67\%$ e $99,02 \pm 1,98\%$. Após acompanhamento, o valor médio do teor encontrado foi de $72,53 \pm 1,31\%$ para as nanoemulsões contendo β -cariofileno, e $80,56 \pm 1,20\%$ para as mesmas espessadas em hidrogel. A concentração de β -cariofileno presente nas nanoemulsões já era esperada, devido à ausência do óleo fixo, e dessa forma, mais moléculas de β -cariofileno foram volatilizadas durante o processo de preparação da formulação (DIAS et al., 2014). Sabe-se ainda, que durante o processo de produção das nanoemulsões, pode haver um aumento na temperatura do homogeneizador a alta pressão, e com isso colaborar para a volatilização de compostos (DIAS et al., 2014). Após o processo de produção, algumas moléculas de β -cariofileno podem ficar aderidas entre a superfície das gotículas e os tensoativos, e com o passar do tempo, esta interação é interrompida, sendo volatilizadas ao meio externo (GALVÃO, 2015). A partir da **Figura 4**, é possível observar que o teor de β -cariofileno é superior nas nanoemulsões espessadas em hidrogel, do que aquelas sem espessamento. A rede polimérica formada pelo Natrosol[®], funciona como uma barreira para que as moléculas aderidas a interface gotícula-tensoativo fiquem adsorvidas e assim, não sejam volatilizadas ao meio, o que permite uma maior quantidade de β -cariofileno ao sistema (LUCCA et al., 2015; PAINES et al., 2015).

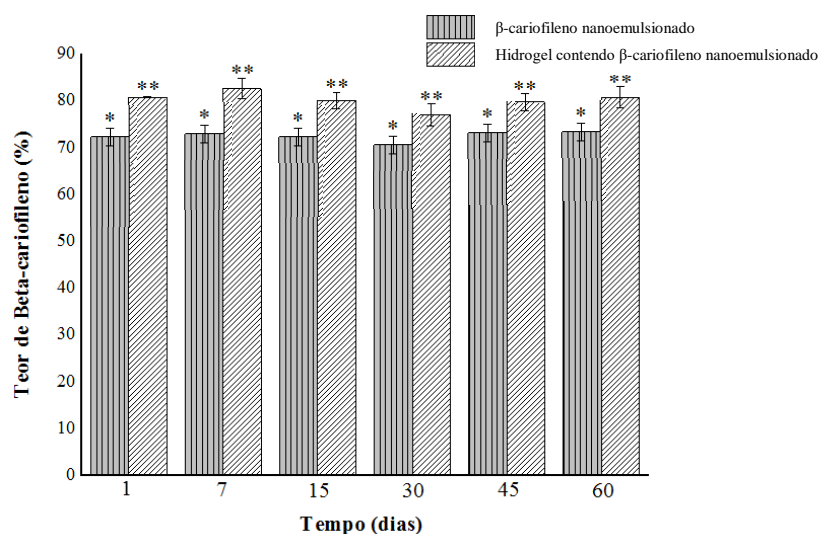


Figura 4. Acompanhamento do teor de β -cariofileno das formulações contendo β -cariofileno por 60 dias

Deste modo, o estudo de acompanhamento da estabilidade permitiu observar que em ambas formulações, armazenadas sob refrigeração, mantiveram suas características iniciais ao decorrer de 60 dias. A partir dos resultados, é possível inferir que estas formulações apresentaram comportamento estável, com tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta compatíveis com nanoemulsões encontradas em literatura (SCHAFFAZICK et al., 2003; SILVA et al., 2006; BRUXEL et al., 2012). Também, os teores de β -cariofileno nas formulações foram capazes de demonstrar que a presença da rede polimérica do Natrosol[®] funcionou como uma barreira capaz de minimizar a volatilização das moléculas de β -cariofileno presentes nas formulações.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho 2005. Dispõe sobre o Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2005.
- BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v.35, n.9, p.1827-1840, 2012.

CARVALHO, J. P.; SANTOS, A. S.; SÁ, A. S.; TEIXEIRA, C. S.; NOGUEIRA, M. S. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. **Revista de Farmácia e Medicina**, v.34, n.6, p.22-27, 2005.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; KOESTER, L. S. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops & Products**, v.59, p.154-162, 2014.

GALVÃO, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico**. 215p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA JR., V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v.17, p.3866–3889, 2012.

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DIAS, D. O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.104, p.144-148, 2015.

PAINES, T. C.; LIMA, J. A.; WEBER, J.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B. Desenvolvimento tecnológico de hidrogéis a partir de nanoemulsão contendo clotrimazol em associação com o óleo de melaleuca. **Ciência e Natura**, v.37, p. 106-115, 2015.

SALES, L. L. M.; SOUZA, A. G.; SOLEDADE, L. E. B.; SANTOS, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J. B.; LONGO, E.; PASKOCIMAS, C. A. Influência do pH sobre a estabilidade de suspensões de alumina estabilizadas eletrostericamente. **Química Nova**, v.30, n.1, p.70-74, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SILVA, C.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA, H. F. Caracterização Físico-química de Nanoemulsões Catiônicas como Sistemas de Liberação de Oligonucleotídeos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.1, p.17-21, 2006.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM-NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v.35, n.1, p.132-137, 2012.

ANEXO 1

Parecer da CEUA

O Anexo I apresenta o parecer de aprovação da CEUA (Comissão de Ética em Uso Animal) da FURG (Universidade Federal do Rio Grande) permitindo a realização dos estudos de cicatrização in vivo.



CERTIFICADO Nº P031/2016

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da atividade cicatrizante do b-cariofileno incorporado em nanoemulsões espessadas em hidrogel", protocolo nº 23116.008233/2015-43, sob a responsabilidade de Cristiana Lima Dora - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 27 de abril de 2016 (Ata 005/2016).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq038/2015
COLABORADORES	Michelle Maidana Altenhofen da Silva; Marília Garcez Correa da Silva; Gabriela Hädrich; Gustavo Richter Vaz; Jonathan Parisotto Peterle
VIGÊNCIA DO PROJETO	01/03/2017
ESPÉCIE/ LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
NÚMERO DE ANIMAIS	258
PESO/ IDADE	250-350 g / 70-90 dias
SEXO	Machos
ORIGEM	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL)/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Março de 2017

Rio Grande, 28 de abril de 2016.

Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
 Coordenador da CEUA-FURG

Figura 1. Parecer de aprovação emitido pela CEUA/FURG para a realização do ensaio de cicatrização *in vivo*