



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Aieli Ledur Martins

**Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas de Poly(ϵ -caprolactona)
contendo β -cariofileno para o tratamento tópico da acne**

FLORIANÓPOLIS
2021

Arieli Ledur Martins

**Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas de Poly(ϵ -caprolactona)
contendo β -cariofileno para o tratamento tópico da acne**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Sayer

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Arieli Ledur

Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas de Poly(ϵ -caprolactona) contendo β -cariofileno para o tratamento tópico da acne / Arieli Ledur Martins ; orientador, Claudia Sayer, coorientador, Cristiane da Costa, coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, 2021.

173 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas poliméricas. 3. Poli(ϵ -caprolactona). 4. Acne. 5. β -cariofileno. I. Sayer, Claudia . II. da Costa, Cristiane . III. de Araújo, Pedro Henrique Hermes . IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Arieli Ledur Martins

**Desenvolvimento de dispersões de nanopartículas de Poly(ϵ -caprolactona)
contendo β -cariofileno para o tratamento tópico da acne**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Cristiano José de Andrade
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira
Coordenador(a) do Programa

Prof^a. Dr^a Claudia Sayer
Orientadora

Florianópolis, 26 de agosto de 2021.

Com todo meu amor, dedico este trabalho aos meus pais,
Antonio Carlos Martins e Marisa Ledur Martins,
por todo o seu amor!

AGRADECIMENTOS

Sozinha nada seria e este trabalho não teria sido realizado...

Minha gratidão, primeiramente a Deus, pela vida e por tudo! Pela proteção, força, sabedoria e coragem necessárias para conclusão deste trabalho.

A toda minha família, vós, tias, tios, primas, primos e aos que não estão mais aqui, meus avôs e tio Guto, pela força que temos juntos, pelo amor que nos une, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo e ajuda sempre que necessitei.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, pelos valores que me ensinaram a partir do exemplo e com tanta sabedoria, pelo incentivo e confiança nos meus estudos, por me possibilitarem o privilégio de estudar, a partir do seu esforço, dedicação e muitas vezes renunciando as suas prioridades. Vocês são fonte de inspiração, força e coragem! Vocês são a base e o porto! Devo tudo que sou a vocês!

Ao meu irmão Alan, pela segurança que sinto só de saber que você existe e está comigo, mesmo distante fisicamente. Te amo!

Às minhas irmãs de alma: Juliane, você é fonte de inspiração, seu amor e sua luz me fortalecem. Rochele, gratidão por sua doçura, amor e cuidado comigo, por dividir o melhor da vida e trazer luz nos dias difíceis.

Às minhas orientadoras: Prof^a Dr^a Claudia Sayer, gratidão pela oportunidade de desenvolver este trabalho com você e toda a sua sabedoria, compartilhada com muita humildade, por acreditar e confiar em mim e no tema da pesquisa, pela sua disponibilidade e interesse em ajudar, pela sua paciência e compreensão neste momento tão delicado e confuso. Você é um grande exemplo de pesquisadora e me inspiro em você! A Prof^a Dr^a Cristiane da Costa, pelos ensinamentos compartilhados nas reuniões e correções, pelo seu incentivo, dedicação e disponibilidade. Vocês foram fundamentais para realização deste trabalho, sou muito grata pela oportunidade de aprender e crescer tendo vocês como exemplos e guias!

Ao meu coorientador Prof Dr Pedro H. H. Araújo pela parceria e contribuições no trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir Veiga, por sua prontidão e gentileza em todas as nossas trocas, pelas amostras de cariofileno e óleo de copaíba.

A todos os professores que passaram por mim e deixaram um pouquinho de si, compartilhando seu conhecimento.

Ao prof Dr Adriano da Silva, por abrir as portas do labMASSA para a utilização da câmara de fluxo.

Ao prof Dr Bruno Augusto Mattar Carciofi, por abrir as portas do PROF1 para a utilização da autoclave.

Ao Arthur Cordeiro, pelo suporte e apoio essenciais para a conclusão deste trabalho; pela disponibilidade e paciência todas as tantas vezes que recorri a ti; por dividir os anseios, ouvir os desabafos, dar um abraço reconfortante e dizer “vai dar tudo certo” quando me derramava em lágrimas (mesmo quando achei que você teria motivos pra estar bravo comigo); por me incentivar e acreditar em mim; pela ajuda com tanta boa vontade e dedicação no ensaio de atividade antimicrobiana, o mérito deste experimento é todo teu e pelas análises de TEM e HPCL. Sua amizade é um presente que quero levar para vida, juntamente com o nosso surf!

À Bernadeth, pela disponibilidade de tempo, disposição e interesse em ajudar nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Ao Bruno Krieger e Luiz Paulo, pela disponibilidade de tempo e paciência nas análises de HPLC, que foram tantas.

Ao Paulo Feuser, pela disponibilidade, contribuições e ensaios de atividade anti-inflamatória e citotóxica.

Ao LINDEN, em especial a Aline, o Thiago, a Jeyse e a Manu, pelas análises de potencial Zeta e LumiSizer.

A central de análises, em especial ao Leandro, que sempre se mostrou disponível e interessado em ajudar, pelas análises de DSC e as frustradas tentativas de análise de tensão interfacial.

Aos amigos e colegas do LCP, por terem tornado meu trabalho mais prazeroso, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio. Em especial à Jana, Jo, Nathalia, Bruno, Heloísa, Thiago, Jeovandro, Rafael, Camila, pelas doses diárias de inspiração, sorrisos e cafés, pelas trocas dentro e fora da UFSC. Acredito muito no potencial de vocês!

A todos os meus amigos, por fazerem minha vida mais feliz, pelo apoio, incentivo e compreensão na ausência. Em especial à Gabi, Lari, Ike, Mar, Rafa, Aline, Josi, Mai, Gustavo, Thomaz, Marco, vocês enxergam e despertam o melhor de mim, gratidão!

Ao Edi, por estar sempre de prontidão e me auxiliar com todas as questões acadêmicas.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro e financiamento do projeto.

A UFSC e ao Posenq por todos os recursos disponibilizados e a oportunidade.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho.

A todas as pessoas que torcem pelo meu sucesso, acreditam em mim, me incentivam e de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aonde estou e me tornasse quem sou.

Gratidão imensa!

Por que separamos o científico, que é apenas uma maneira de buscar pela verdade, daquilo que consideramos sagrado, que são aquelas verdades que inspiram nosso amor e nossa reverência? A ciência nada mais é que uma infundável busca pela verdade. O que pode ser mais profundamente sagrado do que isso? Tenho certeza que a maior parte daquilo que nos é mais caro e precioso, aquilo que todos nós temos como verdade neste exato momento, vai acabar revelando-se, em algum momento futuro, como um mero produto do nosso tempo, de nossa história e de nosso entendimento da realidade. Então temos esse processo, esta maneira, este mecanismo que serve para encontrar pedaços da realidade. Nenhum pedaço individual é sagrado. Mas a busca é.

Ann Druyan

RESUMO

A acne é uma doença inflamatória crônica do folículo pilossebáceo e a mais comum entre as dermatológicas. A manifestação da acne é multifatorial, mas a *Propionibacterium acnes* desempenha um papel central no agravamento da inflamação. A elevada prevalência da acne e seu impacto na qualidade de vida trazem grande relevância para um tratamento mais eficaz. Os medicamentos convencionais contra acne causam efeitos adversos e pouca adesão do paciente. Diversos biativos naturais têm se mostrado fontes mais seguras para o desenvolvimento de novos medicamentos. Tratamentos tópicos direcionados a diferentes fatores fisiopatológicos e alvo-específicos são esforços importantes na busca por novos tratamentos. O β -cariofileno (β CF) é um sesquiterpeno, naturalmente presente em óleos essenciais, como o óleo de copaíba (OC), e demonstrou ser um agente terapêutico multifuncional. Dentre as atividades atribuídas ao β CF, sua ação anti-inflamatória tem destaque, sendo capaz de modular alvos moleculares com implicações importantes na patogênese da acne. Conhecendo-se as potencialidades da utilização de nanopartículas poliméricas para o direcionamento e controle da liberação de ativos, o objetivo deste trabalho foi incorporar o β CF em nanopartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) para o tratamento tópico da acne. Foram desenvolvidas formulações com PCL de duas massas molares, 80 kDa (APCL) e 12,5 kDa (BPCL), e três tipos de sistemas, incorporando apenas o ativo β CF, ou na presença dos coestabilizadores, crodamol ou OC. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio em torno de 200 nm, com distribuição estreita (PDI < 0,29) e pH em torno de 3. O método de miniemulsão-evaporação do solvente se mostrou eficiente, possibilitando alcançar eficiências de encapsulação do β CF superiores a 96%. As imagens de microscopia eletrônica indicaram nanopartículas com morfologia esférica e os resultados de DSC, que os compostos estão dispersos na matriz polimérica de forma amorfa, com menores entalpias para as nanopartículas com APCL e coestabilizadores. A carga superficial das nanopartículas foi negativa e o aumento do pH do meio favoreceu a estabilidade das dispersões. A presença de coestabilizador demonstrou ser um fator fundamental para obtenção de distribuições de tamanho de partículas mais homogêneas e na estabilidade coloidal dos sistemas, possibilitando dispersões estáveis física e quimicamente por mais de 90 dias, e baixo índice de separação de fases, obtido pelo ensaio de estabilidade acelerada. De maneira geral, dispersões de ambos os polímeros na presença de coestabilizador apresentaram parâmetros físico-químicos e estabilidade adequados. Expressiva ação anti-inflamatória foi obtida pelas nanopartículas, reduzindo significativamente a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10. No ensaio de atividade antimicrobiana, a bactéria *Propionibacterium acnes* foi suscetível às nanopartículas com OC ou crodamol, com CIM de 0,31 mg.mL⁻¹. Os nanossistemas não apresentaram efeito citotóxico na avaliação in vitro, indicando biocompatibilidade e segurança para aplicações biomédicas. Ainda que a eficácia específica do β CF na acne precise ser investigada, o presente estudo sugeriu pela primeira vez que o β CF pode contribuir para a terapêutica da acne por meio da modulação do crescimento da *P. acnes* e da resposta inflamatória, quando incorporado em nanopartículas poliméricas de PCL.

Palavras-chave: Acne, β -cariofileno, nanopartículas poliméricas, poli(ϵ -caprolactona), miniemulsificação-evaporação de solvente.

ABSTRACT

Acne is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous follicles and the most common among dermatological ones. The manifestation of acne is multifactorial, but *Propionibacterium acnes* plays a central role in worsening inflammation. The high prevalence of acne and its impact on quality of life bring great relevance for an effective treatment. Conventional acne medications cause adverse effects and poor patient compliance. Several natural bioactives have been shown to be promising and safer sources for the development of new drugs. Topical treatments aimed at different pathophysiological factors and the definition of specific targets are important efforts for better treatment options. β -caryophyllene (β CF) is a sesquiterpene, naturally present in essential oils such as copaiba oil (OC), and has been shown to be a multifunctional therapeutic agent. Among the various activities attributed to β CF, its anti-inflammatory action stands out, being able to modulate molecular targets with important implications in acne pathogenesis. Considering the potential of polymeric nanocarriers for controlled and targeted drug release, the objective of this work was to incorporate β CF into polymeric nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) in order to obtain colloidal dispersions with desirable characteristics as a topical acne treatment. Formulations with PCL of two molar masses, 80 kDa (APCL) and 12,5 kDa (BPCL), and three types of systems were developed, incorporating only β CF, or in the presence of co-stabilizers, crodamol or copaiba oil. The nanosystems were evaluated for β CF incorporation, physicochemical characteristics, stability and activity. The nanoparticles had an average diameter around 200 nm, homogeneous distribution (PDI < 0,29) and the dispersion pH was around 3. The miniemulsification-solvent evaporation method demonstrated to be efficient, achieving β CF encapsulation efficiencies greater than 96%. Electron microscopy images showed nanoparticles with spherical morphology and DSC results indicated that the compounds are amorphously dispersed in the polymeric matrix. APCL and OC containing nanoparticles had lower enthalpies and crystalline domains. The nanoparticles surface was negatively charged, and stability was favored by increasing dispersions pH. A preliminary stability study was carried out by monitoring particle size distribution and pH of the dispersions stored under refrigeration at 4 °C for 90 days, and accelerated stability tests were performed at 25 °C. The presence of co-stabilizer was fundamental to achieve more homogeneous particle size distribution and better colloidal stability, enabling dispersions with stability for 90 days. In general, APCL and BPCL dispersions containing co-stabilizer presented adequate physicochemical parameters and stability. Expressive anti-inflammatory action was obtained by β CF and nanoparticle dispersions, significantly reducing the expression of cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-10. From antimicrobial activity assay, *Propionibacterium acnes* was susceptible to dispersions with OC and crodamol, with CBM of 0,31 and 0,63 mg.mL⁻¹, respectively. The nanosystems did not show cytotoxic effect by in vitro evaluation, indicating biocompatibility and good safety for biomedical applications. Although the specific efficacy of β CF in acne needs to be investigated, the present study suggested for the first time that β CF can contribute to acne therapy by modulating the growth of *P. acnes* and the inflammatory response when incorporated into PCL polymeric nanoparticles.

Keywords: Acne, β -caryophyllene, polymeric nanoparticles, poly(ϵ -caprolactone), miniemulsification-solvent evaporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele e processo de queratinização.	32
Figura 2 - Esquema representativo do folículo pilossebáceo.	33
Figura 3 - Tipos de lesão da acne.	35
Figura 4 - Esquema representativo dos principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da acne.	36
Figura 5 - Estrutura dos sesquiterpenos β -cariofileno, trans-cariofileno (a), (Z)- β -cariofileno (b) e α -humuleno (c) e óxido de cariofileno (d).	44
Figura 6 - Estrutura dos canabinoides tetrahydrocannabinol (a) e canabinol (b).	45
Figura 7 - Esquema representativo de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; (c) fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica da nanoesfera.	56
Figura 8 - Polimerização por abertura de anel da ϵ -caprolactona (a) para síntese de poli(ϵ -caprolactona) (b).	57
Figura 9 - Esquema representativo do método de miniemulsificação-evaporação de solvente.	61
Figura 10 - Principais locais de entrega de fármaco através de sistemas nanoestruturados na pele. (a) Superfície do estrado córneo; (b) linhas de expressão; e (c) folículo pilossebáceo.	68
Figura 11 - Acúmulo de corante nos folículos pilossebáceos. Pele tratada com corante nanoparticulado (a) e corante não particulado (b) com massagem. Pele tratada sem aplicação de massagem com corante nanoparticulado (c) e corante não particulado (d).	69
Figura 12 - Curva padrão para quantificar o teor de β -Cariofileno.	81
Figura 13 - Esquema da técnica de microdiluição em caldo RCM para teste da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (OC), β -cariofileno (β CF) e das dispersões de nanopartículas, frente à bactéria <i>P. Acnes</i>	84
Figura 14 - Efeito da composição no tamanho médio (a) e índice de polidispersão (b) das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL).	91
Figura 15 - Efeito da composição no tamanho médio (a) e índice de polidispersão (b) das dispersões com o polímero de maior massa molar (BPCL).	92

Figura 16 - Efeito da composição no pH inicial das dispersões. (a) polímero de maior massa molar, APCL. (b) polímero de menor massa molar, BPCL.	94
Figura 17 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão. (a) 05- C/βCF 20:80% (APCL, amplificação 25 k). (b) 12- C/βCF 50:50% (BPCL, amplificação 30 k).	95
Figura 18 - Gráficos representando o monitoramento do d_p (I) e PDI (II), durante 90 dias, das dispersões coloidais de APCL, apenas com β CF, 01-βCF e 02-βCF (a), ou na presença de crodamol (b) 03-C , 04-C/βCF e 05-C/βCF ou óleo de copaíba (c) 06-OC , 07-OC/βCF e 08-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.	100
Figura 19 - Gráficos representando o monitoramento do d_p (I) e PDI (II), durante 90 dias, das dispersões coloidais de BPCL, apenas com β CF, 09-βCF e 10-βCF (a), ou na presença de crodamol (b) 11-C , 12-C/βCF e 13-C/βCF ou óleo de copaíba (c) 14-OC , 15-OC/βCF e 16-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.	100
Figura 20 - Gráficos de impressão digital para as dispersões com APCL. (a) 02-βCF , IS = 0,43 (b) 05-C/βCF , IS < 0,0001 e (c) 07-OC/βCF , IS < 0,0001. Ensaio realizado com dispersões sem diluição prévia.	103
Figura 21 - Gráficos de impressão digital para as dispersões com BPCL. (a) 09-βCF , IS = 0,31 (b) 12-C/βCF , IS < 0,0001 e (c) 15-OC/βCF , IS < 0,0001.	103
Figura 22 - Gráficos representando o monitoramento do pH, durante 90 dias, das dispersões coloidais de APCL, apenas com β CF, 01-βCF e 02-βCF (a), ou na presença de crodamol (b) 03-C , 04-C/βCF e 05-C/βCF ou óleo de copaíba (c) 06-OC , 07-OC/βCF e 08-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.	106
Figura 23 - Gráficos representando o monitoramento do pH, durante 90 dias, das dispersões coloidais de BPCL, apenas com β CF, 09-βCF e 10-βCF (a), ou na presença de crodamol (b) 11-C , 12-C/βCF e 13-C/βCF ou óleo de copaíba (c) 14-OC , 15-OC/βCF e 16-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.	107
Figura 24 - Gráficos do potencial Zeta em função do pH das dispersões coloidais de APCL apenas com β CF 01-βCF e 02-βCF (a), ou na presença de Crodamol (b) 03-C , 04-C/βCF e 05-C/βCF ou Óleo de Copaíba (c) 06-OC , 07-OC/βCF e 08-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.	109

Figura 25 - Gráficos do potencial Zeta em função do pH das dispersões coloidais de BPCL apenas com β CF 09-βCF e 10-βCF (a), ou na presença de Crodamol (b) 11-C , 12-C/βCF e 13-C/βCF ou Óleo de Copaíba (c) 14-OC , 15-OC/βCF e 16-OC/βCF . As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.....	110
Figura 26 - Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) do segundo aquecimento. (a): APCL puro (preto), NP-Branca (cinza), 02-βCF (laranja), 05-C/βCF (azul), 07-OC/βCF (verde). (b): BPCL puro, NP-Branca (cinza), 10-βCF (laranja), 13-C/βCF (azul), 12-C/βCF (verde).....	112
Figura 27 - Efeito do β CF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), 02-βCF (■) e 05-C/βCF (■), e de menor massa molar (BPCL), 10-βCF (■) e 12-C/βCF (■), na expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle negativo (□), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μ g.mL ⁻¹ . Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Todos os tratamentos inibiram significativa ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.	122
Figura 28 - Efeito do β CF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), 02-βCF (■) e 05-C/βCF (■), e de menor massa molar (BPCL), 10-βCF (■) e 12-C/βCF (■), na expressão da citocina pró-inflamatória IL-6. Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle positivo (□), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μ g.mL ⁻¹ . Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão Todos os tratamentos inibiram significativa ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.	123
Figura 29 - Efeito do β CF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), 02-βCF (■) e 05-C/βCF (■), e de menor massa molar (BPCL), 10-βCF (■) e 12-C/βCF (■), na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle positivo (□), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μ g.mL ⁻¹ . Os resultados foram expressos pela média \pm desvio. Todos os tratamentos inibiram significativa ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.....	123
Figura 30 - Efeito do β CF (■) e das nanopartículas com o polímero de maior massa molar (APCL), 02-βCF (■) e 05-C/βCF (■), e de menor massa molar (BPCL), 10-βCF (■) e 12-C/βCF (■), na viabilidade celular de monócitos murinos (RAW267) (a) e	

macrófagos murinos (NIHT3T) (**b**) quando cultivados com diferentes concentrações dos ativos (2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos como porcentagem média de sobrevivência $\pm \sigma$, em relação ao crescimento das células na ausência dos ativos, controle negativo (\square). * Variação significativa da viabilidade quando comparados ao controle com $p < 0,05$ 125

Figura 31 - Ensaio de liberação de βCF para a nanopartícula **05-C/ βCF** (verde) do polímero de maior massa molar (APCL) e **12-C/ βCF** (azul) do polímero de menor massa molar (BPCL). 170

Figura 32 - Cromatograma β -Cariofileno. 171

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais tipos de tratamento para acne e sua ação terapêutica.42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações das dispersões coloidais preparadas pelo método de miniemulsificação-evaporação do solvente com poli(ϵ -caprolactona) de 80 kDa (APCL), para encapsulação de β -cariofileno (β CF).....	75
Tabela 2 - Formulações das dispersões coloidais preparadas pelo método de miniemulsificação-evaporação do solvente com poli(ϵ -caprolactona) de 12,5 kDa (BPCL), para encapsulação de β -cariofileno (β CF).....	75
Tabela 3 - Efeito da composição das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL) no tamanho médio, índice de polidispersão e pH iniciais.	90
Tabela 4 - Efeito da composição das dispersões com o polímero de menor massa molar (BPCL) no tamanho médio, índice de polidispersão e pH iniciais.	90
Tabela 5 - Efeito da composição das dispersões na eficiência de encapsulação (EE) do β -Cariofileno. (a) polímero de maior massa molar (APCL) na eficiência de encapsulação (EE) do β -Cariofileno.....	96
Tabela 6 - Resumo dos resultados de estabilidade das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL).	98
Tabela 7 - Resumo dos resultados de estabilidade das dispersões com o polímero de menor massa molar (BPCL).....	98
Tabela 8 - Resultados de DSC referentes ao segundo ciclo de aquecimento do polímero APCL puro (Mn=80 kDa), Np-Branca , 02-βCF , 05-C:βCF e 07-OC/βCF	112
Tabela 9 - Resultados de DSC referentes ao segundo ciclo de aquecimento do polímero BPCL puro (Mn=12,5 kDa), NP-Branca , 10-βCF , 13-C/βCF , 12-C/βCF , 11-C e 15-OC/βCF	113
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das nanopartículas 12-C/βCF e 15-OC/βCF , de BPCL, frente a bactéria <i>Propionibacterium acnes</i>	116
Tabela 11 - Composição β -cariofileno.....	171
Tabela 12 - Composição do óleo de <i>Copaifera multijuga Hayne</i>	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila
ACT - Acetona
AL - Ácido linoleico
AMI - Ácido graxo monoinsaturado
ANOVA - Análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCL - Poli(ϵ -caprolactona) de alta massa molar , 80 kDa
BaCl₂ - Cloreto de bário
BPCL - Poli(ϵ -caprolactona) de baixa massa molar , 12,5 kDa
CALB - *Candida antarctica B*
CB₁-R - Receptor canabinoide tipo 1
CB₂-R - Receptor canabinoide tipo 2
CBM - Concentração bactericida mínima
CHCl₃ - Clorofórmio
CIM - Concentração inibitória mínima
CL - ϵ -caprolactona
COX - Ciclooxigenase
CSLI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*
C _{β CF} - Concentração de β -cariofileno
DCM - Diclorometano
DLS - espalhamento dinâmico de luz
DMEM - Meio Dulbecco's Eagle Modificado
DMSO - Dimetilsulfóxido
d_p - Diâmetro médio em intensidade
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSC - Calorimetria exploratória diferencial
DO - Densidade ótica
DO_c - Densidade ótica do controle
EC - Estrato córneo
EE - Eficiência de Encapsulação
e-ROP - Polimerização enzimática por abertura de anel
EtOH - Etanol

FD - Fase dispersa
FDA - Food and drugs administration
FRAP - Poder de redução do ferro
GPC - Cromatografia por permeação em gel
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ - ácido sulfúrico
HPCL - Cromatografia líquida de alta eficiência
IFN - Interferon
IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
IS - Índice de separação
LOX - Lipoxigenase
LPS - Lipossacarídeo
m - mássico
Mn - Massa molar numérica média
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
Mw - Massa molar ponderal média
NF-κB - Fator nuclear-kappa B
NIH3T3 - Fibroblasto murino
NLR - Receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
NLRP3 - inflamassoma do tipo P3
NO - Óxido nítrico
OC - Óleo de copaíba
OE - Óleo essencial
PCL - Poli(ε-caprolactona)
PDI - Índice de polidispersão;
PGA - Poli(ácido glicólico);
PGE2 - Prostaglandina E2
PHBV - Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
PLA - Poli(ácido láctico);
PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico);
PLLA - Poli(L-ácido láctico);
PPAR - Receptores ativados por proliferados de peroxissoma

PZ - Potencial zeta
RAW267 - Macrofágo murino
RCA - Reinforced Clostridium Agar
RCM - Reinforced Clostridium Médium
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SDS - Dodecil sulfato de sódio;
SE - Sistema endocanabinoide
SEC - Sistema endocanabinoide cutâneo
SNC - Sistema nervoso central
 T_c - Temperatura de cristalização ($^{\circ}\text{C}$)
TEM - Microscopia eletrônica de transmissão
 T_f - Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)
 T_g - Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$);
THC - Tetrahydrocannabinol
THF - Tetrahydrofurano
THP-1 - Monócitos humanos
TLR - Toll-like
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
UFC - Unidades formadoras de colônia
Viab - Viabilidade celular
 βCF - β -cariofileno
 ΔH_c - entalpia de cristalização
 ΔH_f - entalpia de fusão
 σ - Desvio padrão

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	25
1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	28
1.1.1	Objetivo Geral	28
1.1.2	Objetivos Específicos	29
1.1.3	Estrutura da dissertação	29
	CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	PELE	31
2.2	ACNE	34
2.2.1	Manifestação e fisiopatologia	35
2.2.1.1	<i>Aumento na produção de sebo</i>	36
2.2.1.2	<i>Alteração do processo de queratinização</i>	37
2.2.1.3	<i>Colonização do folículo pela Propionibacterium acnes</i>	38
2.2.1.4	<i>Processo inflamatório</i>	38
2.2.1.4.1	Composição do sebo e resposta inflamatória.....	39
2.2.1.4.2	<i>Propionibacterium acnes</i> e resposta inflamatória	40
2.2.2	Formas de tratamento	41
2.3	β -CARIOFILENO E TRATAMENTO DA ACNE	43
2.3.1	Características gerais	43
2.3.2	Lipogênese e sistema endocanabinoide cutâneo	45
2.3.3	Ação antioxidante e resposta inflamatória	47
2.3.4	Cicatrização de feridas	49
2.3.5	Ação antimicrobiana	50
2.3.6	Resumo e considerações finais	52
2.4	SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA ENTREGA DE FÁRMACOS	54

2.4.1	Nanopartículas poliméricas.....	56
2.4.1.1	<i>Poli(ε-caprolactona) (PCL)</i>	57
2.4.2	Técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas	59
2.4.2.1	<i>Emulsificação-evaporação do solvente e miniemulsificação-evaporação do solvente</i>	60
2.4.2.2	<i>Dupla emulsão-evaporação de solvente</i>	63
2.4.2.3	<i>Emulsificação-difusão do solvente</i>	64
2.4.2.4	<i>Deslocamento de Solvente (Nanoprecipitação) ou Deposição interfacial de polímero pré-formado.....</i>	64
2.4.2.5	<i>Salting-out</i>	65
2.4.3	Administração tópica, nanotecnologia e tratamento da acne.....	66
	CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.1	MATERIAIS	72
3.2	MÉTODOS	72
3.2.1	Síntese de Poli(ε-caprolactona) por abertura de anel via enzimática	72
3.2.2	Massa molar da PCL	73
3.2.3	Preparo dos sistemas nanoestruturados.....	73
3.2.4	Tamanho médio das nanopartículas	76
3.2.5	Determinação do pH e estabilidade química das dispersões de nanopartículas.....	76
3.2.6	Estabilidade física das dispersões de nanopartículas.....	77
3.2.7	Potencial Zeta	77
3.2.8	Morfologia das nanopartículas.....	78
3.2.9	Eficiência de Encapsulação do β-Cariofileno (EE_{βCF})	78
3.2.9.1	<i>Doseamento do teor de β-Cariofileno livre</i>	78
3.2.9.2	<i>Correção para as dispersões contendo OC</i>	80
3.2.9.3	<i>Construção da curva analítica</i>	80
3.2.10	Propriedades Térmicas.....	81

3.2.11	Atividade Antimicrobiana	82
3.2.11.1	<i>Obtenção da linhagem bacteriana.....</i>	82
3.2.11.2	<i>Reativação da cepa.....</i>	82
3.2.11.3	<i>Padronização do inóculo</i>	83
3.2.11.4	<i>Soluções dos agentes antimicrobianos</i>	83
3.2.11.5	<i>Microplacas para o ensaio.....</i>	83
3.2.11.6	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</i>	85
3.2.11.7	<i>Determinação Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	86
3.2.12	Citotoxicidade.....	86
3.2.13	Atividade Anti-inflamatória.....	87
	CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES	89
4.1	Tamanho médio de partículas e pH iniciais das dispersões coloidais	89
4.2	Morfologia das nanopartículas.....	94
4.3	Eficiência de Encapsulação das dispersões coloidais.....	95
4.4	Estabilidade das dispersões coloidais	97
4.4.1	Estabilidade Física	99
4.4.1.1	<i>Estabilidade estática.....</i>	99
4.4.1.2	<i>Estabilidade acelerada</i>	101
4.4.2	Estabilidade Química	106
4.4.3	Potencial Zeta	108
4.5	Propriedades térmicas.....	111
4.6	Atividade Antimicrobiana	116
4.7	Atividade Anti-inflamatória.....	121
4.8	Citotoxicidade	125
	CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
5.1	RESUMO DOS RESULTADOS.....	128

5.2	CONCLUSÃO	130
5.3	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	130
	REFERÊNCIAS.....	132
	APÊNDICE A - Estudo prévio das formulações	149
A1.	Polímero de maior massa molar, APCL, 80 kDa.....	149
A2.	Polímero de menor massa molar, BPCL, 12,5 kDa	160
	APÊNDICE B - Perfis de transmissão das dispersões de nanopartículas	164
	APÊNDICE C – Liberação	170
	ANEXO A - Composição β-Cariofileno	171
	ANEXO B - Composição óleo de copaíba	172
	ANEXO C - Cromatograma óleo de copaíba	173

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A acne vulgaris, ou acne, não é uma parte natural do ciclo de vida como visto coloquialmente, mas sim uma doença inflamatória crônica da unidade pilossebácea, que compreende o folículo piloso, a haste do pelo e a glândula sebácea (TUCHAYI *et al.*, 2015). É a oitava doença mais recorrente no mundo e a mais comum entre as doenças dermatológicas. Inicia-se geralmente na adolescência, no entanto, sua prevalência tem sido cada vez maior em adultos, principalmente em mulheres jovens (HAY *et al.*, 2014). Embora não seja mortal, é uma doença com um profundo impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes, causando efeitos psicossociais negativos, como depressão e fobia social, por exemplo (GOLLNICK; FINLAY; SHEAR, 2008).

O aparecimento da acne envolve diferentes fatores que levam a inflamação e na formação de diferentes tipos de lesões. Alguns dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da acne incluem o aumento da quantidade e composição do sebo, a hiperqueratinização folicular e o desequilíbrio do microbioma cutâneo, resultando na proliferação de cepas de *Propionibacterium acnes*, responsável por agravar o quadro inflamatório (DRÉNO, 2017).

Diversos tratamentos tópicos e sistêmicos estão disponíveis para acne. Porém, os regimes de tratamentos combinados, necessários para atingir diferentes aspectos da fisiopatologia da acne, são complexos e levam a uma baixa adesão ao tratamento, prejudicando sua eficácia. Além disso, os tratamentos tópicos convencionais possuem efeitos adversos, como irritação, ressecamento e descamação, também associados a desistência da terapêutica (THIBOUTOT *et al.*, 2009; TUCHAYI *et al.*, 2015). O desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos baseados em nanotecnologia e ativos provenientes de fontes naturais têm se mostrado promissores para reduzir os efeitos adversos causados pelos fármacos e melhorar a eficácia do tratamento. (LIMA *et al.*, 2017; NASRI *et al.*, 2015; RAFIEIAN-KOPAEI, 2012).

As plantas são fontes naturais de inúmeros compostos reconhecidos pelos mais diversos potenciais terapêuticos. A exemplo disso, o β -cariofileno (β CF) é um sesquiterpeno bicíclico natural, abundantemente encontrado em óleos essenciais de

diversas espécies. Dentre elas, caracteriza-se como o composto majoritário do óleo de copaíba, reconhecido por diversas propriedades, como a atividade inflamatória, que está diretamente relacionada com a concentração de β CF na composição no óleo (PACHECO, 2014; VEIGA *et al.*, 2007). O número de estudos envolvendo o β CF cresceu de maneira expressiva nos últimos dez anos, nos quais tem demonstrado propriedades multifarmacológicas e potencial terapêutico para diversas doenças (SANTOS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2016).

A ação anti-inflamatória do β CF foi amplamente reportada na literatura científica através da inibição dos principais mediadores inflamatórios, como fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e enzimas, também envolvidos no processo inflamatório da acne. O β CF apresentou efeitos antimicrobianos generalizados contra vários microrganismos, incluindo a *P. acnes*. Possui forte ação antioxidante e citoprotetora, minimizando a peroxidação lipídica, responsável por causar danos nas paredes celulares e na barreira cutânea, favorecendo o desenvolvimento da acne. Possui ainda uma influência positiva na cicatrização de feridas, um dos danos causados pela acne. Por fim, como um antagonista seletivo dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂-R) e dos receptores ativados por proliferados de peroxissoma (PPARs), é possível que module a proliferação dos sebócitos, e controle a produção do sebo, outros fatores importantes envolvidos na patogênese da acne (AL-TAEE *et al.*, 2019; DAHHAM *et al.*, 2015; DRÉNO, 2017; FRANCOMANO *et al.*, 2019; GERTSCH, 2008; PETERLE *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 1993; SHARMA *et al.*, 2016).

Em função da natureza multifatorial da acne, a busca por tratamentos direcionados a diferentes fatores fisiopatológicos, pode ser uma estratégia terapêutica inovadora para acne. Além disso, a definição de alvos específicos para direcionar os agentes anti-inflamatórios e antibacterianos tópicos, visando restaurar a barreira cutânea e limitar a proliferação de *P. acnes*, são esforços importantes na esperança de melhores opções de tratamento, capazes de limitar os efeitos adversos e aumentar a adesão dos pacientes a terapêutica (DRÉNO, 2017; GOLLNICK *et al.*, 2003; TUCHAYI *et al.*, 2015). Dada a atividade do β CF em múltiplas vias de sinalização farmacológicas e moleculares interconectadas com a patogenia da acne, pode-se especular que o β CF seja um potencial agente terapêutico polifarmacológico para a doença, agindo sobre vários fatores fisiopatológicos.

No entanto, apesar desse potencial terapêutico, o β -cariofileno, é um composto volátil e exibe alta sensibilidade quando exposto a luz e oxigênio. Além disso, sua baixa solubilidade em meio aquoso pode diminuir sua biodisponibilidade e eficácia como fármaco. Portanto, estratégias que garantam sua estabilidade e aumentem sua solubilidade são necessárias para sua utilização no campo farmacêutico (SANTOS *et al.*, 2018). A fim de transpor esses inconvenientes, um nanossistema de entrega de fármaco (nanocarreador) foi proposto, a partir da incorporação do β CF em nanopartículas poliméricas.

Diversos métodos de preparo de nanopartículas poliméricas são descritos na literatura, e sua escolha depende da necessidade da aplicação e características físico-químicas do polímero e do composto a ser encapsulado (GONÇALVES *et al.*, 2016). De maneira geral, os diferentes métodos existentes são baseados na dispersão de polímeros pré-formados ou na polimerização *in situ*, e resultam em uma dispersão coloidal contendo as nanopartículas com tamanho inferior a 1 μ m (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dentre as técnicas com utilização de polímero pré-formado, a miniemulsificação-evaporação do solvente é conhecida por sua eficácia na incorporação de compostos hidrofóbicos, além de possibilitar o preparo de dispersões com maior concentração de ativo e polímero, com uma menor demanda de água (LEIMANN, 2011; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008).

A utilização de nanocarreadores poliméricos pode oferecer uma série de características desejáveis para melhorar a eficácia de entrega de agentes terapêuticos, pelas mais diversas vias de administração. No que se refere a aplicação tópica, as principais vantagens das nanopartículas poliméricas sobre as formulações convencionais estão relacionadas ao controle da liberação, no aumento da *per* e no tempo de residência da substância biologicamente ativa na pele. Além disso, os nanossistemas podem proporcionar a proteção tanto do ativo, frente à degradação a qual se apresenta suscetível, como da pele, prevenindo ou reduzindo efeitos adversos. Outras características indesejadas dos ativos, como a baixa solubilidade e permeabilidade em meio fisiológico, também podem ser melhoradas com sua incorporação em nanopartículas, aumentando sua biodisponibilidade em função da elevada área superficial nas dispersões coloidais (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JUAN *et al.*, 2012; PPAKOSTAS *et al.*, 2011; PROW *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2017; SARACENO *et al.*, 2013).

Estudos evidenciaram que nanopartículas poliméricas são capazes de formar um depósito nos folículos pilossebáceos, proporcionando uma distribuição direcionada, controlada e prolongada do ativo (SCHAEFER; LADEMANN, 2001). Uma vez que o folículo é o local de acometimento da acne, diferentes formulações de nanopartículas desenvolvidas para o tratamento da acne, resultaram em um tratamento mais eficaz e seletivo, com menor dose necessária para desempenhar um determinado efeito, além de minimizar a irritação característica de certos tratamentos convencionais (LADEMANN *et al.*, 2007; OURIQUE *et al.*, 2008; PPAKOSTAS *et al.*, 2011; PROW *et al.*, 2011; ROLLAND *et al.*, 1993).

A natureza do polímero condiciona características importantes dos sistemas coloidais, como a toxicidade e a capacidade de promover liberação controlada e sustentada (COUVREUR *et al.*, 2002; TOIGO, 2015). Os polímeros biodegradáveis, naturais ou sintéticos, são preferíveis para a síntese de nanopartículas destinadas a entrega de fármacos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Dentre os polímeros utilizados, a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) destaca-se devido à alta permeabilidade a muitos bioativos, excelente biocompatibilidade, propriedades mecânicas e facilidade de processamento (DASH; KONKIMALLA, 2012; WOODRUFF; DIETMAR, 2010). Esse polímero vem sendo amplamente utilizado para encapsular diferentes bioativos, inclusive para o tratamento tópico da acne (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; PACHECO, 2014).

Diante do exposto, a incorporação de β -cariofileno (β CF) em nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis, a fim de aumentar sua estabilidade e biodisponibilidade, além de direcionar e controlar a sua liberação no folículo pilossebáceo, aparece com uma estratégia promissora para o tratamento tópico da acne.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é a incorporação do composto natural β -Cariofileno (β CF) em nanopartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), através do

método de miniemulsificação-evaporação do solvente, visando sua aplicação no tratamento tópico da acne.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Obtenção de dispersões de nanopartículas de PCL com massa molar de 80 kDa e 12,5 kDa contendo β -Cariofileno, β -Cariofileno/Crodamol, β -Cariofileno/Óleo resina de copaíba, através do método de miniemulsificação-evaporação do solvente;
2. Avaliar a influência da composição na distribuição do tamanho de partículas (diâmetro médio em intensidade (d_P) e índice de polidispersão (PDI)); pH; eficiência de encapsulação do β CF; morfologia e propriedades térmicas (DSC);
3. Avaliar a influência da variação do pH do meio sobre potencial Zeta das nanopartículas e estabilidade dos sistemas coloidais;
4. Avaliar a influência da composição na estabilidade das dispersões, através do monitoramento do d_P , PDI e pH, durante 90 dias;
5. Avaliar a influência da composição na estabilidade acelerada das dispersões;
6. Identificar as dispersões com as melhores características físico-químicas e estabilidade para :
7. Investigar o potencial bactericida das nanopartículas frente a *Propionibacterium acnes*;
8. Investigar o potencial anti-inflamatório, avaliando o efeito das nanopartículas sobre a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, em cultura de macrófagos RAW 267 estimulados com LPS;
9. Investigar a citotoxicidades, avaliando o efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular de macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (NIH3T3) murinos.

1.1.3 Estrutura da dissertação

O Capítulo I, compreende uma breve introdução, apresentando a motivação e relevância do trabalho, seus objetivos, geral e específicos, e a estrutura da dissertação.

O Capítulo II, contém a revisão bibliográfica utilizada como base deste trabalho e está subdividida em tópicos abordando assuntos como: A função e constituição da pele, enfocando as partes e processos relevantes à patologia da acne; Panorama geral sobre a acne, incluindo a descrição da fisiopatologia a partir dos principais fatores para o desenvolvimento da doença e as principais formas de tratamento; O β -cariofileno e potencialidades para sua utilização como um agente terapêutico antiacne, correlacionando estudos da literatura científica sobre sua ação biológica com os fatores fisiopatológicos da acne; Utilização de sistemas nanoparticulados para entrega de fármacos, destacando a utilização de nanopartículas poliméricas; Algumas das principais técnicas para o preparo de nanopartículas poliméricas; a PCL, suas características e potencialidades para o desenvolvimento de nanocarreadores; por fim, a utilização de nanopartículas para entrega de fármacos por via tópica e para o tratamento da acne.

No Capítulo III são descritos os materiais e métodos utilizados para o preparo e caracterização das dispersões de nanopartículas.

No Capítulo IV os resultados são apresentados e discutidos subdivididos em tópicos.

No Capítulo VII as conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas.

E no Capítulo VIII estão as referências bibliográficas utilizadas no trabalho.

Subsequentemente, o Apêndice A, contém o estudo prévio realizado para definir as formulações base do trabalho; o Apêndice B, contém os gráficos dos perfis de transmissão e índice de separação obtidos pela análise de estabilidade acelerada; o Apêndice C, contém o perfil de liberação das dispersões 05-C/ β CF e 12-C/ β CF; e os Anexos A e B, contém a análise cromatográfica do β -cariofileno e do óleo de copaíba, respectivamente.

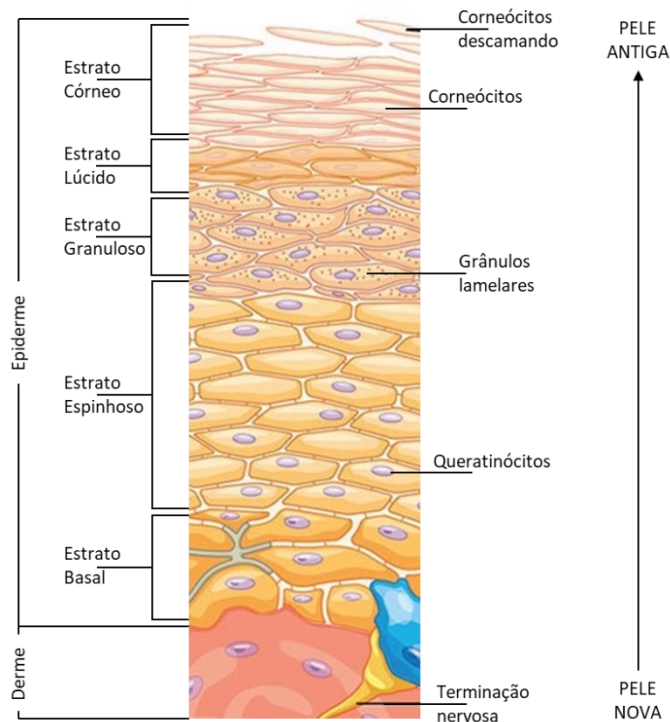
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como primeira barreira para xenobióticos. Ela também evita a desidratação, atua na regulação da temperatura, em respostas imunológicas e na biossíntese de substâncias constitutivas, tais como queratina, colágeno, melanina, lipídios e carboidratos (FILON *et al.*, 2015).

A pele humana é composta por duas camadas, epiderme e derme (Figura 1). Sendo a epiderme a camada mais externa, constituída por lipídios, colesterol e dois tipos de células primárias, os queratinócitos e os não-queratinócitos (BIGA *et al.*, 2003). Aos não-queratinócitos são atribuídas funções de proteção e imunológicas (melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans). Já os queratinócitos são as principais células da epiderme viável, eles são originados na camada basal (limite entre derme e epiderme) e passam por um processo denominado queratinização ao longo das 5 camadas da epiderme. Resumidamente, esse processo consiste em densificar a quantidade de queratina produzida pelos queratinócitos, que são submetidos a um duplo movimento, tornando-se mais planos e migrando no sentido da superfície (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2017; MONTEIRO-RIVIERE, 2010; PROW *et al.*, 2011).

Figura 1 - Estrutura da pele e processo de queratinização.



Fonte: Adaptado de Biga *et al.* (2003).

A superfície da pele, ou camada mais externa da epiderme é denominada estrato córneo (EC) e constitui a principal barreira difusional para evitar a difusão de substâncias endógenas para fora da pele, como por exemplo, a água e nutrientes, bem como para a proteção contra a entrada de substâncias tóxicas indesejadas ou microrganismos (BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002). O EC é constituído por queratinócitos que passaram pelo processo de queratinização e passam a ser denominados corneócitos. Nesse processo, perderam seus núcleos e atividade metabólica, tendo como principal constituinte a queratina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

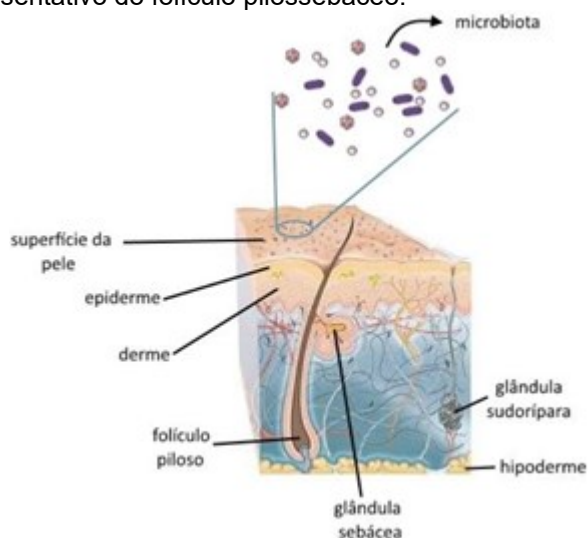
No processo natural de descamação da pele, etapa final do processo de queratinização, se interrompe a ligação intercelular e as células mais externas são despreendidas da superfície. Dependendo do local, a taxa de renovação de queratinócitos está entre 17 e 71 dias (HAYES; KRUGER, 2001).

A derme, por sua vez, é a camada mais interna da pele e é constituída majoritariamente por fibras de colágeno e elastina, e possuem os fibroblastos como principal tipo de célula. Essa camada possui vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (MOSER *et al.*, 2001).

As principais funções da derme são conferir o suporte nutricional para a epiderme avascular, fornecer flexibilidade, atuar como barreira contra inflamações e atuar como reservatório de água (BIGA *et al.*, 2003).

As glândulas sebáceas estão localizadas na derme e são constituídas majoritariamente por células epiteliais denominadas sebócitos. A principal função dessa glândula é a produção de sebo, uma substância oleosa, rica em colesterol, ácidos graxos, ésteres, triglicerídeos e esqualeno (RIBEIRO *et al.*, 2015). Os lipídios sebáceos são responsáveis pela organização tridimensional dos lipídios da superfície da pele, contribuindo para a integridade da barreira cutânea. Eles evitam a desidratação, exibem forte atividade antimicrobiana inata, transportam antioxidantes para a superfície da pele e expressam propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (ZOUBOULIS, 2004). Isso ocorre, pois as glândulas estão unidas ao canal do folículo piloso, o que permite ao sebo engordurar o pelo e a superfície da pele. Quando o folículo está associado a uma glândula sebácea o mesmo pode ser definido como folículo pilosebáceo, esquematicamente representado na Figura 2 (BARBIERI; WANAT; SEYKORA, 2014). As glândulas sebáceas estão localizadas em uma profundidade entre 600 e 1000 µm da superfície da pele (PATZELT *et al.*, 2011).

Figura 2 - Esquema representativo do folículo pilosebáceo.



Fonte: Marangon (2015).

Nos folículos normais, no processo de queratinização, tal como na superfície da pele, os corneócitos são destacados em camadas que se desprendem e são eliminados pelo fluxo de sebo para a superfície da pele. Esse processo promove um

equilíbrio entre a quantidade de células que são eliminadas e a produção de novos queratinócitos (DEGITZ *et al.*, 2007).

2.2 ACNE

De acordo com o Projeto Global de Carga de Doenças, a acne é a oitava doença mais recorrente no mundo e a mais comum entre as dermatológicas (HAY *et al.*, 2014). Inicia-se geralmente na adolescência, atingindo uma taxa entre 70-95% da população de adolescentes entre 15 e 17 anos, e em adultos com idade superior a 25 anos, a acne acomete entre 40-54% da população (CORDAIN *et al.*, 2002). Sua prevalência tem sido cada vez maior em adultos, principalmente em mulheres jovens (HAY *et al.*, 2014).

O impacto da acne na qualidade de vida pode resultar em estresse emocional, carga psicossocial significativa e distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo depressão e suicídio. Profundos efeitos sociais e psicológicos não estão necessariamente relacionados à gravidade da acne ou a idade dos pacientes. Mesmo doenças leves podem ter um impacto negativo no trabalho, nas interações sociais e no humor (LAYTON; THIBOUTOT; TAN, 2021).

Magin *et al.* (2006), em uma revisão sistemática sobre os impactos da acne, identificaram que a depressão e a ansiedade são mais prevalentes entre pacientes com acne do que entre indivíduos do grupo controle, em estudos não-controlados. Em estudos controlados, apenas com pacientes com acne, esses sintomas se comportam de maneira proporcional a gravidade da doença. Além da ansiedade e depressão, um conjunto mais complexo de implicações são causadas pela acne como a diminuição da autoimagem e autoconfiança, fobia social, vergonha, constrangimento, aborrecimento, confusão, somatização e estigmatização.

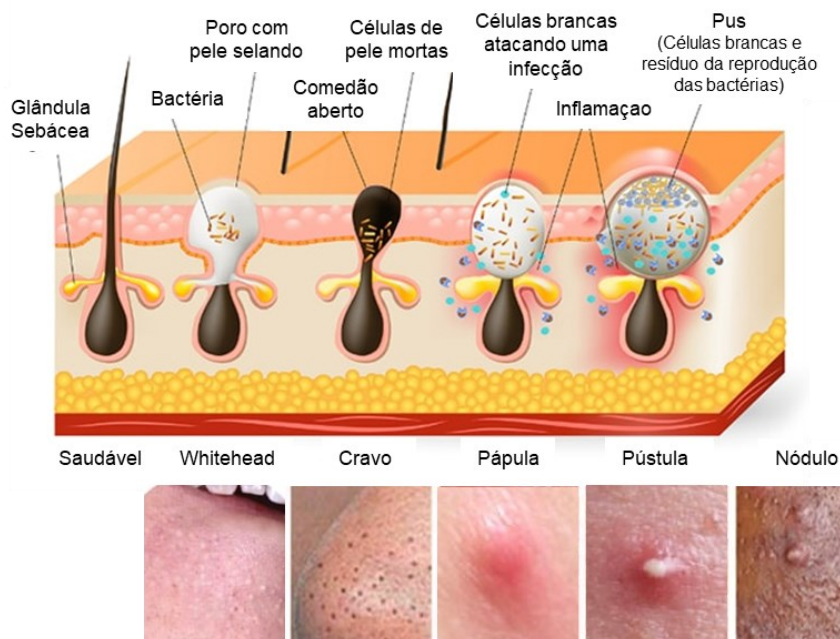
Segundo Mallon *et al.* (1999), o impacto na qualidade de vida de indivíduos com acne é comparável aos efeitos negativos experimentados por pacientes com outras doenças debilitantes graves, incluindo epilepsia, diabetes, asma, dor lombar crônica e artrite. Ainda, pacientes adultos com acne relataram impacto emocional semelhante ao de pacientes com psoríase, e sintomas emocionais mais graves do que adolescentes, possivelmente relacionado à natureza crônica persistente da doença (LASEK; CHREN, 1998).

Quando a acne é tratada, depressão, ansiedade e morbidades psiquiátricas em geral demonstraram melhorar (MAGIN *et al.*, 2006). Nesse sentido, o tratamento eficaz pode ter um impacto psicossocial positivo nos problemas relacionados à acne ou cicatrizes, evidenciando a necessidade de um gerenciamento eficaz e oportuno ao longo da duração da doença.

2.2.1 Manifestação e fisiopatologia

A manifestação clínica da acne é nomeada comedão e pode se apresentar na forma fechada ou aberta. Os comedões abertos são comumente conhecidos como cravos e se caracterizam por pontos pretos. Os fechados, ou espinhas, possuem coloração branca ou vermelha e não apresentam poro central atenuado (KNUTSEN-LARSON *et al.*, 2012; THIBOUTOT *et al.*, 2009). Tradicionalmente, as lesões na forma de comedões abertos são definidas como não-inflamatórias e as lesões fechadas, como inflamatórias e se caracterizam pela presença de pápulas, pústulas e nódulos (Figura 3) (EUROPEAN DERMATOLOGY FORUM, 2016).

Figura 3 - Tipos de lesão da acne.



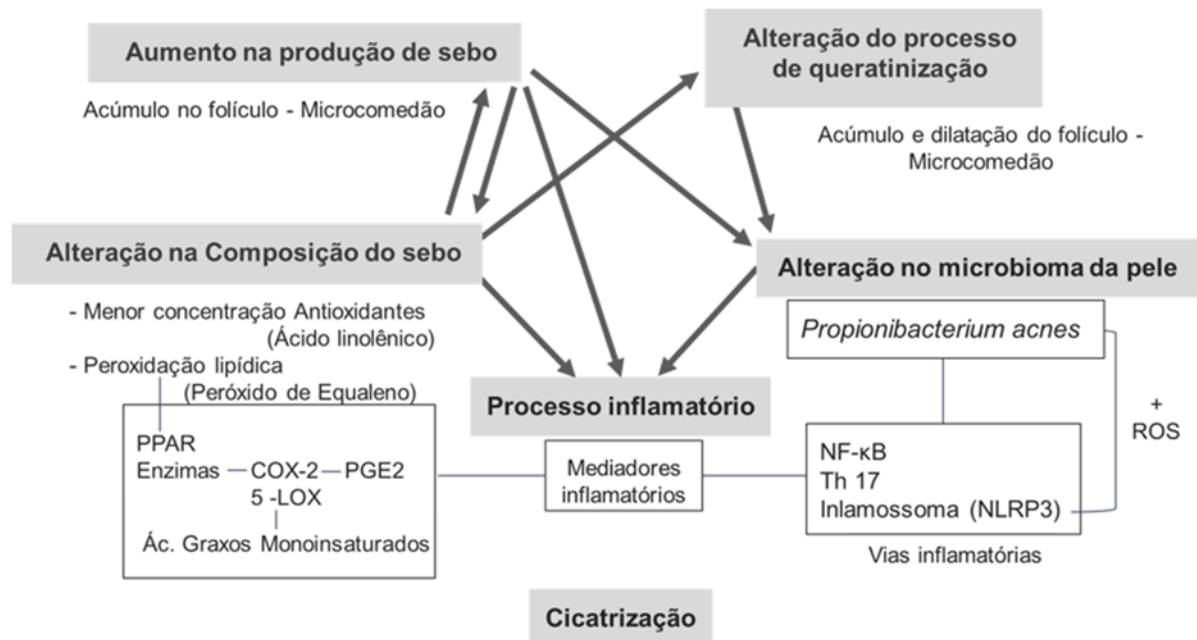
Fonte: Adaptado de Filipowicz (2017) e Acneuosuna (2016).

O folículo pilosebáceo é o local da manifestação da acne, por essa razão, as regiões da face, peito e costas são as áreas que mais manifestam a doença, proporcionalmente a maior concentração de glândulas sebáceas (GOLLNICK et al., 2003).

O processo de patogênese da acne é complexo, envolvendo diferentes substâncias químicas e hormonais, e até o momento não se tem uma definição completa e exata da sua fisiopatologia (JIN; LEE, 2018; PAWIN et al., 2004). Porém, uma série de estudos elucidam algumas diretrizes que possibilitam uma compreensão do mecanismo de desenvolvimento da doença.

Alguns dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da acne estão representados na Figura 4 e incluem o aumento da produção e alteração da composição do sebo pelas glândulas sebáceas, alteração do processo de queratinização, colonização do folículo pela *Propionibacterium acnes* e inflamação. Esses mecanismos se correlacionam entre si e serão detalhados nos itens subsequentes.

Figura 4 - Esquema representativo dos principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da acne.



Fonte: Autora (2021).

2.2.1.1 Aumento na produção de sebo

O aumento da quantidade de sebo produzido pelas glândulas sebáceas (hiperseborreia) é o principal fator associado ao início da manifestação clínica da acne. Esse aumento pode ser desencadeado por fatores internos, como alterações hormonais ou genética, ou externos (TUCHAYI *et al.*, 2015). Um forte aumento na excreção de sebo ocorre por volta dos 9 anos com a produção de andrógenos, principalmente testosterona, e se intensifica ao longo da puberdade. A atuação local dos androgênios aumenta o tamanho das glândulas sebáceas e a quantidade de sebo excretada até que o nível adulto seja atingido, aproximadamente aos 17 anos (BAUMANN, 2013; GOLLNICK *et al.*, 2003). A predisposição genética tem se mostrado um importante fator predisponente que influencia o número, tamanho e atividade da glândula sebácea (RIBEIRO *et al.*, 2015). Fatores externos, como uma dieta rica em alimentos com alta carga glicêmica, estresse emocional, uso de cosméticos comedogênicos, detergentes agressivos e alguns medicamentos também podem alterar o funcionamento das glândulas sebáceas (RIBEIRO *et al.*, 2015; TUCHAYI *et al.*, 2015).

Há evidências de que os sebócitos e os queratinócitos foliculares têm os mecanismos celulares necessários para metabolizar os andrógenos. No entanto, um desequilíbrio entre o aumento da produção de sebo e a sua capacidade de metabolização leva ao bloqueio do sebo no folículo, causando a formação do microcomedão e possível evolução da doença (GOLLNICK *et al.*, 2003).

2.2.1.2 Alteração do processo de queratinização

Outro fator que leva ao desenvolvimento da acne é a alteração no processo de queratinização folicular, levando a um aumento da produção de queratinócitos - hiperqueratinização (GOLLNICK *et al.*, 2003). Os corneócitos, que normalmente seriam eliminados através do folículo, se acumulam no folículo, juntamente com gotículas de lipídios, formando o microcomedão (RIBEIRO *et al.*, 2015). Em pacientes propensos a acne, esse processo enche o folículo pilosebáceo com uma mistura de bactérias, sebo e queratina, desenvolvendo uma lesão clinicamente visível, o comedão (PAWIN *et al.*, 2004).

2.2.1.3 Colonização do folículo pela *Propionibacterium acnes*

A principal bactéria envolvida na patogênese da acne é a *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), que é uma bactéria gram-positiva anaeróbia facultativa e possui 6 fitotipos. Esse microrganismo está naturalmente presente na pele e é dominante no folículo pilossebáceo, uma vez que utiliza o sebo como fonte de nutriente (KNUTSEN-LARSON *et al.*, 2012). Por essa razão, os dois fatores fisiopatológicos descritos anteriormente, que geram o acúmulo de sebo e de corneócitos, induzem o aumento da colonização da *P. acnes* no folículo pilossebáceo (BAUMANN, 2013).

A alta proliferação da *P. Acnes* gera uma forte atividade pró-inflamatória, estimulando a ativação de receptores Toll-like (TLRs) (BELLEW; THIBOUTOT; DEL ROSSO, 2011). Esses receptores fazem parte do primeiro sistema de defesa contra microrganismos e são ativados quando entram em contato com padrões moleculares associados à patógenos, desencadeando uma cascata inflamatória com a produção de citocinas, dentre muitos outros fatores pró-inflamatórios (KIM *et al.*, 2002). Outras vias inflamatórias também são ativadas pela *P. acnes* e a reação inflamatória se prolifera nos comedões, podendo levar a difusão da inflamação a camadas mais profundas da pele a partir da degradação tecidual (PAWIN *et al.*, 2004).

2.2.1.4 Processo inflamatório

Acreditava-se que as respostas inflamatórias fossem a última etapa na manifestação da acne e só ocorresse após a colonização da *P. Acnes* (BAUMANN, 2013). No entanto, Jeremy *et al.* (2003) verificaram elevada expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 em torno dos folículos, durante os eventos iniciais da doença. Assim, os autores constataram que o processo inflamatório ocorre logo após a hiperseborréia, que resulta na ruptura da barreira da pele e liberação de mediadores inflamatórios, antes mesmo da hiperproliferação da *P. acnes* e da ativação dos queratinócitos (JEREMY *et al.*, 2003). Em complemento, Gollnick, Finlay, Shear (2008), com base em evidências histológicas, imunológicas e clínicas, sugeriram que a inflamação ocorre em todos os estágios do desenvolvimento da lesão acneica, indicando que a acne é uma doença inflamatória crônica ou primária.

Ainda que as vias imunoquímicas relacionadas ao início e à propagação da inflamação na acne não sejam completamente elucidadas, a resposta inflamatória pode envolver a *P. acnes* ou não (TANGHETTI, 2013). Desse modo, a bactéria não é exclusivamente a causa da inflamação da acne, porém, desempenha um papel evidente no agravamento da inflamação e manifestação clínica da doença.

2.2.1.4.1 Composição do sebo e resposta inflamatória

A relação entre inflamação e lipogênese pode ser crucial para elucidar totalmente a patogênese da acne, uma vez que a acne foi definida como uma doença inflamatória, desencadeada primeiramente por frações lipídicas do sebo pró-inflamatórias (JIN; LEE, 2018).

A constituição do sebo varia de acordo com a quantidade produzida (disseborreia). Nesse sentido, foi constatada uma relação inversamente proporcional da concentração de ácido linoleico (AL) do sebo em relação à secreção de sebo, ou seja, quanto maior a excreção de sebo, menor a concentração de AL. Esse ácido graxo desempenha um papel importante na manutenção da barreira cutânea devido à sua alta capacidade antioxidante (BAUMANN, 2013; DOWNING *et al.*, 1986).

A composição do sebo de pacientes com acne apresenta níveis mais elevados de peróxido de esqualeno e ésteres de cera, e mais baixos de compostos antioxidantes como AL e vitamina E, comparado a pessoas sem a doença (HUANG *et al.*, 2014). Um nível mais baixo de ácido linoleico está envolvido na hiperqueratose folicular, na formação de comedões e disfunção da barreira cutânea, em função da maior produção de radicais livres de oxigênio na parede folicular, facilitando a permeabilidade de microrganismos e ácidos graxos pró-inflamatórios na derme (HARVEY; HUYNH, 2014; OTTAVIANI; CAMERA; PICARDO, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2015).

A elevada concentração de peróxidos lipídicos no sebo pode ativar os receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs), que são fatores de transcrição nuclear que atuam sobre o metabolismo lipídico pelos sebócitos e na inflamação. Os PPAR- γ induzem a atividade das enzimas lipoxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX), subsequentemente, aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias na acne, além de fornecer um ambiente adequado para a proliferação

de *P. acnes* (JIN; LEE, 2018; TANGHETTI, 2013). As enzimas 5-LOX e COX-2 são expressas em maior extensão na pele com acne em comparação com a pele de indivíduos saudáveis (TUCHAYI *et al.*, 2015).

A expressão da COX-2 pode ser induzida através de múltiplas vias de sinalização relacionadas a inflamação ou infecção. Essa enzima induz a produção Prostaglandina E2 (PGE2), que está relacionada a produção de sebo (lipogênese) em sebócitos. Altos níveis de PGE2, também foram identificados em lesões inflamatórias de acne e sua expressão se correlaciona com a gravidade da lesão da acne. (BAKRY *et al.*, 2017).

A 5-LOX catalisa a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, produzindo ácidos graxos monoinsaturados (AMIs), implicados em doenças inflamatórias caracterizadas por hiperproliferação de queratinócitos. Tanto os AMIs como os peróxidos lipídicos são considerados frações lipídicas do sebo pró-inflamatórios e estão associados ao desenvolvimento de lesões da acne (OTTAVIANI; CAMERA; PICARDO, 2010; TUCHAYI *et al.*, 2015).

2.2.1.4.2 *Propionibacterium acnes* e resposta inflamatória

De acordo com o que foi exposto anteriormente, sabe-se que a colonização por *P. acnes* e seus antígenos, como lipolissacarídeos (LPS) e proteinases, implicam no agravamento da resposta inflamatória através de ligação com receptor do tipo Toll-like (TLR) em queratinócitos, sebócitos e macrófagos, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios e a atração de células do sistema imunológico, como neutrófilos, monócitos e linfócitos. (HUANG *et al.*, 2014).

A partir da investigação de lesões acneicas, Kang *et al.* (2005), obtiveram evidências de que a inflamação causada pela *P. acnes* é mediada pela ativação do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF-κB). Quando ativado, esse fator age no núcleo da célula, e regula a produção de diversos genes inflamatórios e imunológicos, incluindo interleucinas (IL), IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2) (HUANG *et al.*, 2014). Lesões faciais de acne apresentaram níveis de mRNA significativamente maiores de IL-1β (16 vezes), IL-8 (3015 vezes), IL-10 (46 vezes) e TNF-α (2,6 vezes), em comparação à pele adjacente não envolvida na lesão (KANG *et al.*, 2005). Níveis

aumentados de IL-8 atraem células inflamatórias, incluindo leucócitos e linfócitos (DRÉNO, 2017).

Além disso, a *P. acnes* induz os leucócitos (T CD4) a ativarem vias de resposta T helper (TH), TH17 e TH1, que secretam as citocinas IL-17 e interferon γ (IFN γ). A ativação das citocinas relacionadas a TH17 em lesões de acne indicam que essa via pode desempenhar um papel central no processo da doença, possivelmente oferecendo novos alvos para a terapia (DRÉNO, 2017).

Ainda, a imunidade inata pode ser ativada por receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo NOD-like (NLR). Esses receptores auxiliam na identificação de microrganismos e moléculas com potencial danoso para a célula, como as espécies reativas de oxigênio (ROS). Ao ser ativado o NLR forma um complexo multiproteico recebendo a denominação de inflamossoma (NEVES *et al.*, 2015). A *P. acnes* desencadeia a ativação do inflamassoma do tipo P3 (NLRP3), resultando na liberação de IL-1 β em monócitos, macrófagos e sebócitos. Essa ativação depende de proteinases e ROS, que são comumente observadas em locais de inflamação. Na presença de um inibidor de ROS a secreção de IL-1 β induzida por *P. acnes* em sebócitos via NLRP3 foi bloqueada, indicando que agentes antioxidantes tem potencial ação na inibição dessa via inflamatória (LI *et al.*, 2014).

2.2.2 Formas de tratamento

Do mesmo modo que a fisiopatologia da acne é complexa e multifatorial, o seu tratamento também é variável e requer diferentes etapas adaptadas para cada paciente. Não existe uma causa isolada nem uma medicação única que funcione para todos os pacientes. No entanto, a intervenção precoce e o tratamento preventivo são eficazes na resolução da maioria dos casos (BAUMANN, 2013).

Os fármacos mais utilizados para o tratamento da acne incluem retinóides (tópicos ou sistêmicos), antibióticos (tópicos ou sistêmicos), peróxido de benzoíla e hormônios inibidores da produção de andrógeno (somente para mulheres) (Quadro 1) (GOLLNICK *et al.*, 2003). A combinação desses agentes é comum, visto que a maioria dos medicamentos não agem em todos os fatores fisiopatológicos, com exceção da isotretinoína, que é um retinóide oral (THIBOUTOT *et al.*, 2009).

Quadro 1 - Principais tipos de tratamento para acne e sua ação terapêutica.

Retinóides	Retinóides orais	Antibióticos	Peróxido de Benzoíla	Hormônios
Normalizar a descamação folicular. Alguns reduzem a resposta inflamatória.	Normalizar a descamação folicular. Reduzir a resposta inflamatória. Reduzir a produção de sebo e a <i>P. acnes</i> indiretamente.	Reduzir os microrganismos. Reduzir a resposta inflamatória indiretamente, alguns, diretamente.	Reduzir os microrganismos	Normalizar a descamação folicular Reduzir a produção de sebo

Fonte: Adaptado de Gollnick *et al.* (2003).

Existem algumas diretrizes gerais com respeito ao tratamento da acne que são comuns ao Guia Europeu e Americano. Dentre elas, recomenda-se que o tratamento tópico seja a primeira escolha para tratar a doença, limitando o emprego de tratamento sistêmico apenas para formas mais severas, com lesões nodulares e císticas (EUROPEAN DERMATOLOGY FORUM, 2016; ZAENGLEIN *et al.*, 2016). Os medicamentos para acne devem atingir a camada mais superficial da pele, por permeação via folículo e entrega específica no local de acometimento da doença, porém sem penetrar através da derme e gerar efeitos sistêmicos (PROW *et al.*, 2011).

Dentre os tratamentos tópicos, existe um consenso de que os retinóides (isolados ou em combinação) devem ser a primeira linha de terapia para cravos e comedões tradicionalmente definidos como inflamatórios, em estágio leve a moderado (THIBOUTOT *et al.*, 2009). Os retinóides são capazes de normalizar o processo de queratinização e também considerados essenciais na manutenção da terapia quando os tratamentos orais são interrompidos, mas causam efeitos colaterais como irritação e descamação cutânea (LAYTON, 2006).

A resistência a antibióticos é uma das principais causas de falhas no tratamento da acne e aumentou quase 40% entre as décadas de 1980 e 2000 (COATES *et al.*, 2002; SADHASIVAM *et al.*, 2016). Devido a esse mecanismo de resistência proveniente da plasticidade genética das bactérias surge outra recomendação geral: evitar a utilização de antibiótico local e sistêmico concomitantemente, e, em vez disso, combiná-los com outros agentes tópicos, como retinóides ou o peróxido de benzoíla, para diminuir o risco de desenvolvimento de resistência da bactéria (THIBOUTOT *et al.*, 2009).

2.3 β -CARIOFILENO E TRATAMENTO DA ACNE

Conforme descrito anteriormente, existe uma ampla variedade de tratamentos convencionais para acne, no entanto, nenhum desses métodos está isento de efeitos colaterais e seu papel exato na terapia não está claro (LIMA *et al.*, 2017). Por essa razão, medicamentos complementares e alternativos, utilizando ativos provenientes de fontes naturais são bastante relevantes, uma vez que têm mostrado menos efeitos colaterais, além da capacidade de diminuir os efeitos adversos induzidos por outras drogas (LIMA *et al.*, 2017; NASRI *et al.*, 2015; RAFIEIAN-KOPAEI, 2012).

Considerar a acne como uma doença inflamatória crônica traz alterações nas diretrizes que recomendam seu tratamento com retinóides. De acordo com Gollnick *et al.* (2003), espera-se que um agente capaz de inibir o crescimento de *P. acnes* e suprimir a resposta inflamatória proporcione benefícios significativos para pacientes com acne. Tuchayi *et al.* (2015) também sugerem que agentes anti-inflamatórios, além da definição de alvos específicos e a busca por uma cura multipotencial permanente e segura, são esforços importantes na esperança de melhores opções de tratamento para acne e maior adesão dos pacientes. Por fim, Dréno (2017) destaca que restaurar a barreira natural da pele para direcionar os agentes anti-inflamatórios, limitar a proliferação de *P. acnes* com antibacterianos tópicos que não causem resistência e regular o fluxo e a composição de sebo serão os principais desafios do tratamento da acne no futuro.

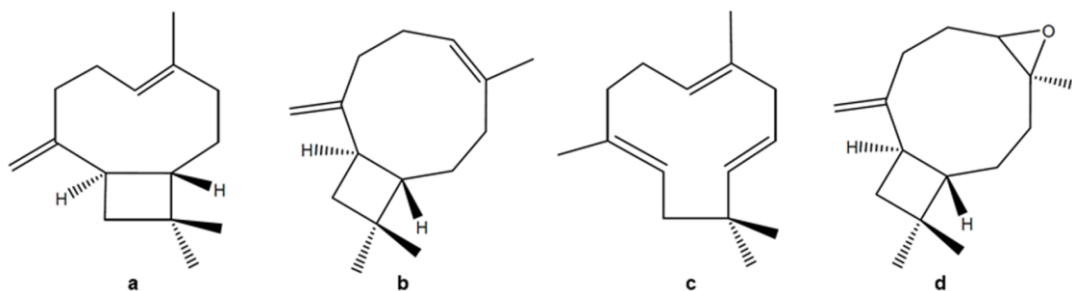
Nesse contexto, o β -cariofileno (β CP), uma molécula bioativa de origem natural e com atividades farmacológicas relacionadas aos fatores fisiopatológicos da acne, destaca-se como um potencial agente terapêutico para essa doença.

2.3.1 Características gerais

O β -cariofileno ($C_{15}H_{24}$) é constituído por três unidades de isopreno e não possui oxigênio em sua fórmula química, sendo classificado como sesquiterpeno hidrocarboneto (Figura 5.a) (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Na natureza, o β CP ocorre principalmente como trans-cariofileno ((E)- β CF) (**a**) misturado com uma pequena quantidade dos isômeros (Z)- β -cariofileno ((Z)- β CF) (**b**) e α -humuleno (α -

cariofileno) (c), e seu derivado de oxidação, óxido de cariofileno (O β CF) (d) (Figura 5) (CHAPPELL; COATES, 2010).

Figura 5 - Estrutura dos sesquiterpenos β -cariofileno, trans-cariofileno (a), (Z)- β -cariofileno (b) e α -humuleno (c) e óxido de cariofileno (d).



Fonte: Autora (2021).

De maneira geral, os terpenos são compostos considerados seguros. O β CF é classificado pela Food and Drugs Administration (FDA) e outras agências reguladoras, como composto “geralmente reconhecido como seguro” para consumo humano, sendo utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como aditivo, intensificador de sabor e conservante (CALLEJA *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2016).

O β CF é encontrado em óleos essenciais de muitas espécies de plantas relacionados por várias atividades farmacológicas importantes (MACHADO *et al.*, 2018). Dentre elas, destaca-se o óleo de copaíba (OC), do qual o β CF geralmente é o composto majoritário e o marcador, com concentração variando entre 36 e 85% para o óleo resina da espécie *Copaifera multijuga* Hayne (SILVA *et al.*, 2017). Dentre outras atividades biológicas comprovadas, o β CF possui ação cicatrizante, antimicrobiana e anti-inflamatória (PACHECO, 2014; VEIGA *et al.*, 2007).

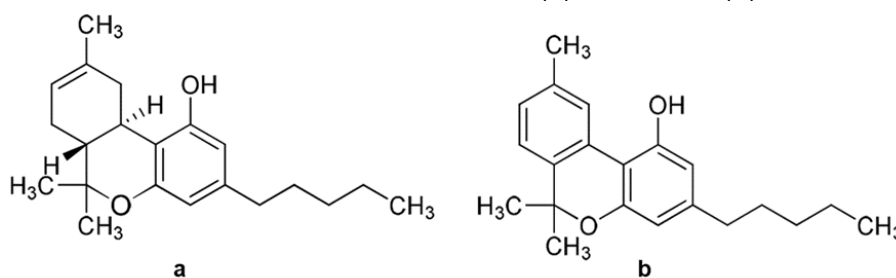
Dentre elas, destaca-se o óleo de copaíba (OC), do qual o β CF geralmente é o composto majoritário e o marcador, sendo atribuído a ele diversas atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana e anti-inflamatória (PACHECO, 2014; VEIGA *et al.*, 2007).

Nos artigos de revisão, Francomano *et al.* (2019), Leandro *et al.* (2012), Machado *et al.* (2018), Santos *et al.* (2018), Sharma *et al.* (2016) e Veiga (2002), descrevem o β CP como um agente terapêutico multifuncional, com atividades farmacológicas relacionadas a doenças inflamatórias, neuroinflamatórias e neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla e esclerose lateral

amiotrófica), do sistema nervoso (dor neuropática, lesões espinhais e cerebrais, acidente vascular cerebral, isquemia, transtorno de ansiedade, depressão), gastrointestinais (colite), cardiovasculares, renais, hepáticas (fibrose e isquemia hepática), metabolismo (osteoporose, diabetes, obesidade), dor e alguns tipos de câncer (côlon, mama, pâncreas, linfoma, melanoma e glioma).

O β CP pertence à família dos canabinoides, que são ligantes dos receptores canabinoides presentes no organismo. O sistema endocanabinoide (SE) é uma antiga rede de sinalização lipídica presente nos mamíferos, que modula funções neuronais, diminuindo os sinais relacionados ao estresse que levam à processos inflamatórios crônicos e a certos tipos de dor. Os receptores canabinoides, CB₁-R e CB₂-R, estão envolvidos na regulação de neurotransmissores responsáveis pela manutenção do equilíbrio energético, no metabolismo e na resposta imune. Devido a sua estrutura química diferenciada, o β CP é um agonista seletivo de CB₂-R, ao contrário dos canabinoides mais conhecidos e tradicionais, como tetrahydrocannabinol (THC) (**a**) e canabinol (**b**) (Figura 2), que são capazes de ativar ambos os receptores. Além disso, por não ativar os CB₁-Rs, o β CP não induz efeitos colaterais centrais nem psicotrópicos (FRANCOMANO *et al.*, 2019; KLEIN; NEWTON, 2007).

Figura 6 - Estrutura dos canabinoides tetrahydrocannabinol (**a**) e canabinol (**b**).



Fonte: Autora (2021).

Os itens subsequentes trazem estudos com β CP e OC que se relacionam com os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da acne, descritos anteriormente.

2.3.2 Lipogênese e sistema endocanabinoide cutâneo

Dentre os fatores implicados na ocorrência da acne, a secreção de sebo pode ser considerado o principal, associado ao início da manifestação clínica da acne. O

aumento da secreção de sebo é uma característica dos pacientes com acne, e se correlaciona com a gravidade da acne, afetando, principalmente as respostas inflamatórias (TUCHAYI *et al.*, 2015).

Embora as funções mais bem estudadas sobre o sistemas endocanabinoide estejam relacionadas ao sistema nervoso central e aos processos imunológicos, esforços experimentais nas últimas duas décadas confirmaram a existência de um sistema endocanabinoide funcional cutâneo (SEC) envolvido em vários processos biológicos, incluindo a manutenção da homeostase da pele e a formação e regeneração da barreira cutânea (TÓTH *et al.*, 2019). Outras funções atribuídas ao SEC, como o controle do crescimento e diferenciação dos sebócitos, da secreção de sebo e das respostas imunológicas, inferem seu papel na patogênese da acne (DRÉNO, 2017).

Oláh *et al.* (2014) exploraram a atuação de outro ligante CB₂-R, o canabidiol (CBD), em estudo com sebócitos, e evidenciaram seu comportamento como: agente sebostático, capaz de inibir a lipogênese induzida por agentes “pró-acne” de forma quantitativa e qualitativa; agente supressor da proliferação de sebócitos, inibindo assim a lipogênese dos sebócitos; e agente anti-inflamatório, inibindo a expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Acredita-se que o controle da proliferação de sebócitos e da produção de lipídios foi mediada pela ativação do receptor endocanabinoide, modulando a expressão dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs). A lipogênese em folículos sebáceos é estimulada pela suprarregulação do PPAR- γ . Assim, antagonistas específicos de PPAR- γ podem ser considerados candidatos a agentes anti-acne (JIN; LEE, 2018).

Gertsch, (2008) demonstrou pela primeira vez que β CF atua como um agonista completo, potente e seletivo do receptor canabinoide tipo 2 (CB₂-R). Como outros ligantes CB₂-R, o β CF inibiu as vias inflamatórias desencadeadas pela ativação do complexo receptor Toll-like CD14 / TLR4 / MD2, que normalmente leva à expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , *in vitro*. O autor constatou ainda, que o β CF exerce potentes efeitos anti-inflamatórios em estudo com camundongos, sendo mais eficaz na menor dose oral testada (5 mg.Kg⁻¹). Assim, inferiu que a ingestão desse composto pode modular de forma benéfica o sistema endocanabinoide, possivelmente através da modulação das vias do TNF- α . No entanto, sugere que estudos adicionais terão que determinar se o β CF também está

biodisponível em humanos e como exatamente os ligantes CB₂-R modulam a inflamação *in vivo*.

Ainda não foram realizados ensaios sobre o controle da proliferação dos sebócitos e da secreção do sebo com o β CF, no entanto, uma vez que é agonista do CB₂-R, seu comportamento poderia ser similar ao canabidiol e sua ação como agente antiacne contemplaria dois fatores fisiopatológicos importantes no desenvolvimento da doença.

2.3.3 Ação antioxidante e resposta inflamatória

A peroxidação lipídica das membranas celulares é o principal dano causado por espécies reativas de oxigênio as células. É iniciada por radicais hidroxila e ânions superóxidos, levando à formação de radicais peroxila que, por fim, propagam a reação em cadeia nos lipídios (GUO *et al.*, 2014). Em função disso, assim como na acne, em que o estresse oxidativo causa danos à barreira cutânea e alterações imunoinflamatórias, essas fatores são comuns na patogênese de várias doenças (SANTOS *et al.*, 2018). Nesse sentido, diversos mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios do β CF foram elucidados para o tratamento de diversas patologias envolvendo outros tipos de células.

No estudo de Calleja *et al.* (2013), β CF foi definido como um ativo capaz de proteger lesões hepáticas induzidas por estresse oxidativo. Dentre os terpenos testados, α -pineno, canfeno, α -humuleno, cânfora, borneol, 1,8-cineol, β CF foi o único que demonstrou forte efeito inibitório na peroxidação lipídica em células hepáticas (CFSC-2G), com inibição significativamente maior do que o α -tocoferol (Vitamina E) e probucol, utilizados como controles positivos. Além disso, β CF reduziu significativamente a formação de peróxidos lipídicos pela 5-LOX. De acordo com a literatura, o tratamento de pacientes com acne utilizando um inibidor de 5-LOX reduz a contagem de lesões inflamatórias e também podem diminuir a atividade inflamatória de linfócitos e macrófagos, resultando em efeitos benéficos cumulativos (TUCHAYI *et al.*, 2015).

Em ensaios para avaliar a capacidade de eliminar radicais livres, β CF mostrou ação antioxidante potente como sequestrante dos radicais hidroxila (reação de Fenton), ânion superóxido (ensaio de riboflavina), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

(DPPH) e de redução do Fe^{+2} (FRAP), catalisador de reações de oxidação, como Fenton e Haber-Weiss. O βCF apresentou atividade de maneira dose-dependente e superior aos controles positivos utilizados nos ensaios (CALLEJA *et al.*, 2013; DAHHAM *et al.*, 2015).

Os receptores CB_2 são expressos em células microgliais - macrófagos encontrados no sistema nervoso central (SNC), responsáveis por remover infecções e neurônios danificados. Em função disso, muitos estudos são feitos com antagonistas desses receptores, como o βCF , visando a atividade neuroprotetora. A exemplo disso, os estudos de Guo *et al.* (2014) e Hu *et al.* (2017), com células microgliais induzidas a inflamação, indicaram que o tratamento com βCF suprimiu a resposta neuroinflamatória impedindo a ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κB). Também mostraram inibição significativa da produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2), como consequência da redução da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), além de menor secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 TNF- α e IL-1. Tendo conhecimento de que a ativação do NF- κB é facilitada por condições associadas a um estado redox intracelular aumentado, Guo *et al.* (2014) avaliaram a atividade antioxidante do βCF , e constataram significativa inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). No trabalho de Guimarães-Santos *et al.* (2012), o óleo de copaíba também foi reportado como agente neuroprotetor, por meio da modulação da resposta inflamatória aguda induzida. Os autores identificaram menor recrutamento de micróglis e neutrófilos, em animais tratados com OC. Em função disso, tanto o βCF , como o OC são considerados capazes de induzir a neuroproteção do sistema nervoso central (SCN).

O estresse oxidativo e inflamatório no pâncreas tem sido implicado no aparecimento e progressão da diabetes mellitus, em decorrência da hiperglicemia. Visando um agente terapêutico para diabetes, no estudo de Al-tae *et al.* (2019), a administração oral de βCF foi capaz de impedir os danos mediados por estresse oxidativo/inflamatório nos tecidos pancreáticos de ratos diabéticos com a redução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além de mostrar potente ação anti-inflamatória através da regulação dos mediadores iNOS e COX-2 juntamente com a atenuação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, promovendo efeitos cardioprotetores.

O modelo inflamatório de macrófagos estimulados por LPS é amplamente reconhecido por desempenhar um papel crítico na resposta inflamatória, simulando

também a ação bacteriana, que a partir da liberação de fragmentos da sua parede celular, como LPS, induz a liberação de mediadores inflamatórios (JIN; LEE, 2018). Utilizando esse modelo com células humanas (THP-1), Gelmini *et al.* (2013), identificaram que o óleo de copaíba foi capaz de inibir a translocação nuclear de NF- κ B e a liberação das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , de forma dose-dependente. Enquanto, Veiga *et al.* (2007) utilizaram esse modelo com macrófagos murinos e reportaram a inibição da expressão do óxido nítrico (NO), quando as células foram tratadas com três espécies diferentes de óleo de copaíba, *Copaifera multijuga Hayne*, *Copaifera cearensis Huber ex Ducke* e *Copaifera reticulata Ducke*. Nesse estudo, a diminuição do recrutamento de leucócitos e neutrófilos com a ingestão dos óleos também foi verificada, a partir da indução da inflamação em camundongos. Dentre os três óleos avaliados, o maior efeito anti-inflamatório está relacionado com a maior concentração de β CF na composição dos óleos, o qual compõem 57,5% do óleo da espécie *Copaifera multijuga Hayne*, a mais ativa nos dois modelos de teste empregados (VEIGA *et al.*, 2007).

No modelo inflamatório de edema de pata induzido por carragenina, o β CF diminuiu a produção de prostaglandina E2 e a expressão de IL-1 β TNF- α e de iNO (FERNANDES *et al.*, 2007). O óleo de copaíba também foi capaz de inibir o edema (VEIGA *et al.*, 2001)

Por fim, diferentemente dos estudos apresentados até aqui, Dias *et al.* (2014) constataram os efeitos imunomoduladores do óleo de copaíba, via modulação da resposta imune Th17, com a supressão das citocinas IFN- γ e IL-17, além da inibição da produção peróxido de hidrogênio (H₂O₂), NO e da expressão de TNF- α .

Com base nesse conjunto de resultados, através de diferentes modelos inflamatórios, β CF e OC modularam a expressão de todos os mediadores inflamatórios relacionados a patogênese da acne descritos até o momento.

2.3.4 Cicatrização de feridas

As lesões da acne possuem grande potencial de causar cicatrizes de vários níveis e até desfigurações (HASSUN, 2000; LIMA *et al.*, 2017). A redução desses sinais é importante para evitar os danos psicossociais que implicam na qualidade de vida de pacientes com acne (GOLLNICK; FINLAY; SHEAR, 2008).

A cicatrização de feridas cutâneas consiste em um processo complexo, que ocorre em três estágios sequenciais e sobrepostos: inflamação, formação do novo tecido e remodelação. Diversos mediadores (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) e células (leucócitos, fibroblastos e queratinócitos) precisam interagir coordenadamente para a reformulação da pele (KOYAMA *et al.*, 2019; PETERLE *et al.*, 2020). Estudos etnofarmacológicos destacam o uso tradicional do óleo de copaíba na cicatrização de feridas (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA, 2002).

Dois trabalhos apresentaram investigações sobre o tratamento tópico com β CF na cicatrização de feridas, em camundongos. Koyama *et al.* (2019) verificaram que o β CF aumentou a reepitelização, devido a maior proliferação e migração de células, e controlou a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL6. Em seu estudo, foi utilizado um dispositivo contendo o ativo diluído em óleo vegetal sobre a ferida com concentração de 50 mg por kg do animal, sobre a ferida de espessura total. Já no estudo de Peterle *et al.* (2020), 15 μ L dos tratamentos, com aproximadamente 1,5 mg de β CF, foram aplicadas por 12 dias em feridas dorsais de 8 mm de diâmetro produzidas por punção. Nesse estudo foi avaliado o β CF puro, uma nanoemulsão contendo β CF e um hidrogel contendo a nanoemulsão. Os resultados mostram que os tratamentos contendo β -cariofileno diminuíram o processo inflamatório agudo, com a redução da expressão dos marcadores IL-1 e TNF- α e foram mais eficientes que o grupo tratado com controle positivo (óleo Dersani®). Dentre os tratamentos contendo o ativo, o hidrogel mostrou-se mais eficiente do que a emulsão ou composto puro, em função da sua maior bioadesividade.

Ambos os trabalhos estão de acordo com Wang *et al.* (2016), que verificaram que a ativação do CB₂-R pode melhorar a cicatrização de feridas, reduzindo a inflamação, acelerando a reepitelização e atenuando a formação de cicatrizes. Inferindo que agonistas CB₂-R podem ser uma nova perspectiva para a terapia de feridas cutâneas.

2.3.5 Ação antimicrobiana

Alterações no microbioma natural da pele – disbiose, pode causar perturbações na barreira cutânea e desencadear o processo inflamatório. Dentre os microrganismos que compõem a flora bacteriana da pele, a bactéria gram-positiva *P.*

acnes é a que mais contribui na resposta inflamatória, conforme descrito anteriormente. Além disso, sabe-se que *P. acnes* é capaz de criar um biofilme formado por polissacarídeos extracelulares. Essa cola biológica aumenta sua aderência as paredes foliculares, conferindo resistência aos agentes antimicrobianos (DRÉNO, 2017; JIN; LEE, 2018).

Para restaurar o equilíbrio natural do microbioma e a barreira natural da pele, o uso de compostos antibacterianos tópicos, como o peróxido de benzoíla, ou botânicos, que não induzem resistência antibacteriana, pode ser uma alternativa privilegiada para limitar o biofilme cutâneo e a problemática da resistência bacteriana aos antibióticos (DRÉNO, 2017).

Devido aos mecanismos de resistência e ao surgimento de efeitos adversos, as terapêuticas antibacterianas estão se tornando menos eficazes. Em função disso, nas últimas décadas, a utilização de compostos derivados de plantas medicinais como agentes antimicrobianos tem se expandido consideravelmente (SHARMA *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais têm sido usados desde os tempos antigos para tratar infecções, sendo conhecidos por exibir atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de bactérias e fungos. A natureza lipofílica de seus componentes permite que eles interajam facilmente com os ácidos graxos da membrana celular microbiana (RAI *et al.*, 2017; ZANETTI, 2018).

Na literatura existem dois registros de atividade antimicrobiana do β CF frente a *P. acnes*, com concentração inibitória mínima (CIM) inferior a $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando uma grande suscetibilidade da bactéria ao β CF (KUBO *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1993). De maneira geral, ele é um fitoquímico utilizado como conservante natural para proteger alimentos de patógenos (SHARMA *et al.*, 2016). Possui atividade antimicrobiana tanto contra bactérias gram-positivas, como bactérias gram-negativas, sendo as bactérias gram-positivas mais suscetíveis que as gram-negativas (DAHAM *et al.*, 2015; GOREN *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2006). Dahham *et al.* (2015) associaram a atividade antimicrobiana do β CF a sua forte atividade antioxidante. Foi relatado ainda, sua atividade frente a bactéria gram-positiva *Streptococcus mutans*, destacando sua capacidade de penetrar o biofilme formado por essa cepa associada a cárie dental (YOO; JWA, 2018).

Um grande volume de trabalhos científicos evidencia a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, proveniente de diversas espécies do gênero

Copaifera. Apesar do efeito sinérgico com os demais compostos do óleo, muitas vezes a ação antimicrobiana foi atribuída ao β CF. A maioria dos trabalhos identificaram ação do OC frente a bactérias gram-positivas (FARIA, 2014; MARANGON, 2015; MASSON *et al.*, 2013; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; NEVES *et al.*, 2018; PIERI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008). Dentre esses ensaios, apenas Neves *et al.* (2018), Pieri *et al.* (2012) e Mendonça e Onofre (2009) obtiveram resultado com cepas gram-negativas, o que pode ser atribuído a maior rigidez e complexidade de sua parede celular (RAI *et al.*, 2017).

2.3.6 Resumo e considerações finais

Ainda que a utilização do β CF como agente terapêutico multifarmacológico para acne não tenha sido realizada, o conjunto de funções atribuídas ao β CF, torna-o um alvo com grande relevância na busca por um ativo antiacne. A seguir, uma lista resumindo os principais pontos que justificam essa hipótese, correlacionando as potencialidades terapêuticas do β CF apresentadas na literatura, com os fatores fisiopatológicos da acne:

- O β CF foi capaz de modular a expressão do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B) e a expressão das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2). (FERNANDES *et al.*, 2007; GELMINI *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2018; VEIGA *et al.*, 2001, 2007).

A *P. acnes* ativa o NF- κ B, que regula a produção desses mediadores (KANG *et al.*, 2005);

- O OC foi capaz de modular a via de resposta Th17, com a supressão da expressão das citocinas IFN- γ e IL-17 (DIAS *et al.*, 2014).

A *P. acnes* induz vias de resposta Th17 e a inibição dessa via pode ser uma nova alternativa para o tratamento da acne (DRÉNO, 2017);

- Como ligante dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs), o β CF foi capaz de modular a expressão das enzimas 5-LOX, COX-2 e da

prostaglandina E2 (PGE2) (AL-TAEE *et al.*, 2019; CALLEJA *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017).

Esses mediadores estão implicados na regulação da produção de sebo, proliferação dos sebócitos e oxidação dos ácidos graxos (peroxidação lipídica), causando disfunções na barreira cutânea e a promoção da inflamação (BAKRY *et al.*, 2017; TUCHAYI *et al.*, 2015);

- Como ligante seletivo dos receptores endocanabinoide tipo 2 (CB₂-R) e PPARs, o βCF melhorou a cicatrização de feridas, reduzindo a inflamação e acelerando a reepitelização (KOYAMA *et al.*, 2019; PETERLE *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2016).

As cicatrizes causadas por lesões acneicas são um dos danos causados pela doença, causando efeitos psicossociais negativos aos pacientes (GOLLNICK; FINLAY; SHEAR, 2008; TUCHAYI *et al.*, 2015);

- O βCF mostrou elevada capacidade de eliminar radicais livres e minimizar a peroxidação lipídica, evidenciando forte ação antioxidante e citoprotetora (AL-TAEE *et al.*, 2019; CALLEJA *et al.*, 2013; DAHHAM *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017).

- Agentes antioxidantes podem suprimir a liberação de IL-1β mediada pelo inflamassoma NLRP3, ativado pela *P. acnes* nos sebócios (LI *et al.*, 2014);

Danos a barreira cutânea de pacientes com acne ocorrem como consequência da peroxidação lipídica e dos menores níveis de agentes antioxidantes na composição do sebo (HUANG *et al.*, 2014);

- O βCF mostrou forte atividade antimicrobiana frente a uma ampla variedade de bactérias, incluindo a *P. acnes*, e foi capaz de penetrar o biofilme formado por *Streptococcus mutans* (DAHHAM *et al.*, 2015; GOREN *et al.*, 2011; KUBO *et al.*, 1994; RAI *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 1993; SCHMIDT *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2016; YOO; JWA, 2018).

A *P. acnes* é reconhecida como a bactéria que mais contribui com o agravamento do quadro inflamatório na acne e é capaz de criar um biofilme, conferindo resistência aos agentes antimicrobianos (DRÉNO, 2017; JIN; LEE, 2018).

- Além disso, uma investigação sobre a interação do β CF com outros medicamentos utilizados atualmente pode proporcionar uma combinação sinérgica, maximizar a eficácia e minimizar efeitos adversos (SHARMA *et al.*, 2016).

Embora as evidências experimentais disponíveis sejam promissoras, ainda não estão disponíveis no mercado medicamentos apenas com β CF, indicando que mais ensaios precisam ser conduzidos para a tradução dos achados em animais para humanos. No entanto, em função da baixa toxicidade desse composto e das extensas aplicações terapêuticas, que são raramente observadas para um fitoquímico, não é surpresa que ele tenha potencial para angariar interesse e manterá sua popularidade para pesquisas farmacológicas e farmacêuticas futuras (FRANCOMANO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2016).

Por fim, apesar do potencial terapêutico multifuncional e das perspectivas promissoras do β CF, existem alguns obstáculos que dificultam sua utilização, como a baixa solubilidade, a suscetibilidade à oxidação e sua volatilidade. Para transpor esses inconvenientes, sistemas de liberação inovadores e utilizando nanotecnologia podem ser desenvolvidos como forma de estratégia para melhorar sua entrega e desempenho em aplicações farmacológicas (SANTOS *et al.*, 2018).

2.4 SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA ENTREGA DE FÁRMACOS

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que envolve a aplicação de conhecimento científico para controlar e reestruturar a matéria nos níveis atômicos e moleculares, desenvolvendo sistemas com tamanho entre 1 e 1000 nm – nanoescala, e explorando suas propriedades e funções fundamentalmente novas (ANTONIO *et al.*, 2014; ROCO *et al.*, 2011). A ciência em nanoescala pode interferir em quase todos os tipos de materiais, como polímeros, metais, compósitos, formando nanoblocos como, nanopartículas, nanotubos, nanofibras e nanocompósitos (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

As propriedades únicas atribuídas à dimensão nanométrica são reconhecidas por proporcionarem melhores desempenhos, tornando os nanomateriais altamente desejáveis para as mais diversas aplicações e setores. Em função disso, a

nanotecnologia está associada a um grande impacto tecnológico e econômico, o que justifica sua rápida progressão e crescente número de iniciativas e pesquisas envolvendo nanotecnologia e diferentes campos da ciência (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; LÜ *et al.*, 2009; TOMA, 2005).

A aplicação da nanotecnologia na medicina está associada ao desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos mais eficazes e seguros (BEGINES *et al.*, 2020; CRAPARO *et al.*, 2011). Esses sistemas podem ser obtidos através da nanoencapsulação, que consiste na incorporação de agentes terapêuticos aos nanomateriais, formando nanocarreadores (ABDI, 2010). Nos últimos anos, houve uma transformação global no campo da nanomedicina, levando a uma abordagem multidisciplinar e colaborativa com uma série de estudos indicando resultados promissores da utilização de nanocarreadores direcionados aos mais diversos tipos de tratamentos e vias de administração, como intravenosa, oral, subcutânea e cutânea (BARRAT, 2000; BEGINES *et al.*, 2020; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A nanotecnologia aplicada para entrega de fármacos pode oferecer uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores convencionais, dentre elas: a liberação controlada, sustentada, prolongada e direcionada do fármaco; o aumento da biodisponibilidade e absorção do fármaco; a redução de efeitos adversos e da toxicidade relacionados ao fármaco; proteção do ativo contra possíveis instabilidades; diminuição da dose terapêutica e do número de administrações; e a incorporação de mais de um princípio ativo em um mesmo nanocarreador (BEGINES *et al.*, 2020; BURGESS; HICKEY, 2002; CRAPARO *et al.*, 2011; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JUAN *et al.*, 2012; KAYSER; LEMKE; HERNANDEZ-TREJO, 2005; RAI *et al.*, 2017).

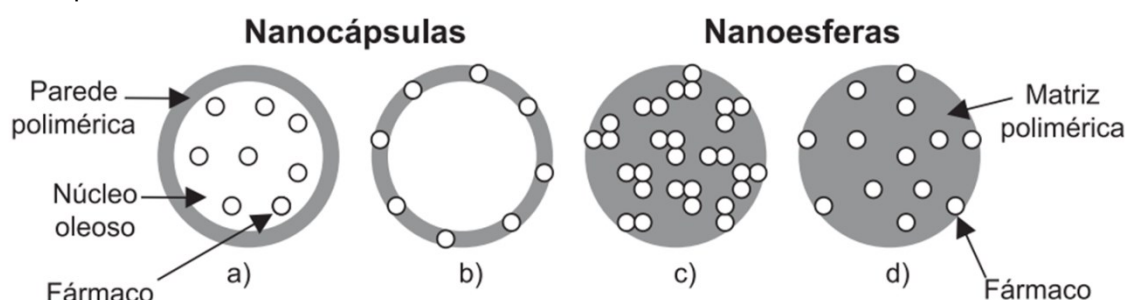
A escolha do material precursor de um sistema de entrega nanoestruturado é um ponto chave para a obtenção das características desejadas, visando o aprimoramento da aplicabilidade e dos resultados alcançados por esses sistemas. A grande versatilidade dos polímeros é uma característica considerada ideal para o preparo de nanocarreadores, pois possibilita a personalização em função da aplicação desejada, por meio de modificações em um dado polímero, através de funcionalização, por exemplo, ou a escolha de outro polímero com propriedades mais adequadas. Ademais, nanopartículas poliméricas se destacam como uma ferramenta

fundamental para melhorar a biodisponibilidade ou a entrega específica de fármacos no local de ação (BEGINES *et al.*, 2020; BRUSCHI, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

2.4.1 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 μm , que podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo de sua estrutura e composição (Figura 7) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanoesferas (**c** e **d**) constituem um sistema com organização matricial das cadeias poliméricas, não sendo possível diferenciar um núcleo, enquanto as nanocápsulas (**a** e **b**) apresentam um núcleo, geralmente líquido, delimitado por um invólucro polimérico. Considerando os mecanismos de encapsulação, o fármaco pode estar retido (**c**), disperso (**b**, **d**), ou adsorvido (**b**, **d**) no polímero, ou dissolvido no núcleo oleoso (**a**) das nanopartículas (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 7 - Esquema representativo de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. **(a)** fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; **(b)** fármaco adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; **(c)** fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; **(d)** fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica da nanoesfera.



Fonte: Schaffazick e Guterres (2003).

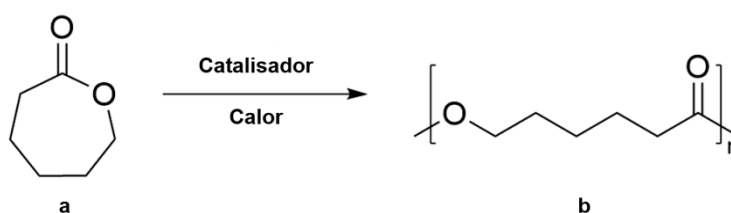
O material precursor das nanopartículas deve preferencialmente atender a alguns requisitos como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade. (BEGINES *et al.*, 2020). Em função disso, polímeros biodegradáveis, naturais ou sintéticos, são preferíveis para o preparo de nanopartículas destinadas a entrega de fármacos. Sua degradação *in vivo*, gera subprodutos biocompatíveis e toxicologicamente seguros, sendo metabolizados e eliminados naturalmente. Na literatura, para a preparação de nanopartículas destinadas à entrega de diversos agentes terapêuticos, destacam-se a utilização do poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido

glicólico) (PGA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), entre os polímeros biodegradáveis sintéticos, e quitosana e gelatina, entre os naturais (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004b; CHEVALIER; GONZALEZ; ALVAREZ, 2015; HANS; LOWMAN, 2002; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

2.4.1.1 Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

Uma das principais classes de polímeros biodegradáveis são os poliésteres alifáticos sintéticos, da qual faz parte a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 8.b). A rota mais empregada para sua produção é a polimerização por abertura de anel (ROP) de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos), que pode ser mediada por catalisadores aniônicos, catiônicos ou de coordenação. A utilização de catalisadores biológicos, como enzimas, é preferível aos catalisadores metálicos, pois não deixam resíduos organometálicos, considerados tóxicos, no produto final. A ϵ -caprolactona (ϵ -CL), (Figura 8.a) é o monômero mais comumente utilizado para polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP), por gerar um produto de fácil caracterização, e a lipase *Candida antarctica B* (CALB), é a mais aplicada, por ser extremamente eficaz para catalisar e-ROP de ϵ -caprolactona (GUINDANI *et al.*, 2017; VENERAL, 2014).

Figura 8 - Polimerização por abertura de anel da ϵ -caprolactona (a) para síntese de poli(ϵ -caprolactona) (b).



Fonte: Autora (2021).

A PCL é bastante estudada no campo biomédico devido à sua facilidade de moldagem e fabricação, especialmente em função da sua boa solubilidade, compatibilidade de mistura e baixo ponto de fusão (59-64 °C). Além disso, caracteriza-se como um polímero hidrofóbico e semi-cristalino, e em função disso, degrada-se lentamente em condições fisiológicas (WOODRUFF; DIETMAR, 2010).

Contudo, sua degradação pode ser alcançada em poucos dias ou semanas na presença de enzimas, como a lipase de *Pseudomonas*, ou modificada, a partir de funcionalizações e copolimerizações, por exemplo (GONÇALVES *et al.*, 2016; WOODRUFF; DIETMAR, 2010). Os fatores que influenciam na degradação da PCL são a cristalinidade, massa molar, temperatura de transição vítrea e dimensões da amostra global, pois implicam no acesso da água às ligações éster (JENKINS; HARRISON, 2006).

Esse poliéster é adequado e amplamente explorado no desenvolvimento de nanopartículas para a entrega controlada de fármacos devido à sua alta permeabilidade a muitos ativos, excelente biocompatibilidade e capacidade de ser totalmente excretado do corpo uma vez que é biorreabsorvível (DASH; KONKIMALLA, 2012; WOODRUFF; DIETMAR, 2010). Além disso, possui um custo consideravelmente mais baixo do que outros poliésteres biodegradáveis, como PGA, PLA e seus copolímeros (BYUN *et al.*, 2011). Outro fato importante é que os nanocarreadores desenvolvidos com PCL possuem aprovação e registro de marca da Food and Drug Administration (FDA), o que torna mais rápida sua entrada no mercado (GUINDANI *et al.*, 2017; WOODRUFF; DIETMAR, 2010).

A liberação de fármacos incorporados a nanopartículas de PCL depende da concentração de PCL e do ativo, do tipo de formulação, método de preparação, tamanho da nanopartícula, além dos fatores descritos anteriormente com relação a degradabilidade (SINHA *et al.*, 2004). Uma vez que a degradação do PCL ocorre a uma taxa muito mais lenta do que a liberação do fármaco, muitos estudos relataram que a difusão através da matriz polimérica é o principal mecanismo pelo qual compostos lipofílicos são liberados de nanopartículas de PCL (DASH; KONKIMALLA, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2016; JEONG; LEE; CHO, 2003). No entanto, o mecanismo de degradação do polímero em qualquer formulação altera indiretamente o perfil de liberação de compostos encapsulados ou incorporados (DASH; KONKIMALLA, 2012). Espera-se que as nanopartículas de PCL se degradem mais rapidamente *in vivo* do que *in vitro*, devido a resposta imune e a maior concentração de lipase e outras enzimas degradantes de PCL no corpo (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Além disso, a degradação e, conseqüentemente, a liberação de ativos de nanopartículas de PCL ocorre de maneira dependente do pH, temperatura e do tipo de surfactante utilizado (GONÇALVES *et al.*, 2016). Nos estudos de Coffin e McGinity

(1992) e Musyanovych *et al.* (2008), nanopartículas preparadas com o surfactante iônico SDS foram mais suscetíveis à hidrólise *in vitro* do que aquelas preparadas com surfactante não iônico (Tween 80, Pluronic F-68 ou Lutensol AT50). Coffin e McGinity (1992), atribuíram a degradação mais rápida das nanopartículas preparadas com SDS a um ataque nucleofílico das ligações éster de PCL pelo ânion sulfato derivado do SDS, que teria catalisado o processo de degradação, enquanto Musyanovych *et al.* (2008) atribuíram à presença dos grupos iônicos de SDS na superfície da partícula, que aumentam a difusão da água através da matriz polimérica. O armazenamento à 4 °C de dispersões coloidais aquosas de PCL retardou efetivamente a degradação, mesmo em pH baixo (pH 1,65). No entanto, a degradação ocorre muito mais rapidamente em pH 1,65 e 37 °C, com diminuição do massa molar quase duas vezes mais rápida em pH 1,65 do que em pH 3,1, pH 5,1 ou pH 7,4 (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008).

2.4.2 Técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas

Existem na literatura diversos métodos de preparação de nanopartículas e a escolha de uma técnica em particular varia de acordo com as propriedades físico-químicas do composto encapsulado, do polímero empregado e das propriedades de superfície das nanopartículas poliméricas, que influenciam a aplicação e o direcionamento específico desejado para as nanopartículas produzidas (GONÇALVES *et al.*, 2016). O método escolhido pode influenciar em muitas características do sistema nanoparticulado, como a eficiência de encapsulação, tamanho e polidispersão, que por sua vez, afetam a liberação e atividade (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005). Porém, independentemente do método utilizado, o resultado é uma dispersão coloidal contendo as nanopartículas, onde a água atua como dispersante na maioria das vezes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Park, Ye e Park (2005) listaram alguns requisitos para a escolha da técnica apropriada para a preparação de nanopartículas poliméricas. De acordo com os autores, o método escolhido deve: conservar a estabilidade e atividade do fármaco incorporado; obter sistemas com eficiência de encapsulação e rendimento que viabilizem a produção em massa; resultar sistemas com partículas na faixa de tamanho compatível com a via de administração, com estreita distribuição do tamanho

e facilmente ressuspensas em água; apresentar perfil de liberação reprodutível e buscar evitar a liberação inicial na forma de *burst*.

De maneira geral, os diferentes métodos existentes são baseados na dispersão de polímeros pré-formados ou na polimerização *in situ*. Nesse caso, as nanopartículas poliméricas são formadas ao mesmo tempo que o polímero por meio da polimerização de um monômero, através de técnicas como a polimerização em emulsão (COSTA *et al.*, 2013; PATROCINIO *et al.*, 2019), miniemulsão (CARDOSO; ARAÚJO; SAYER, 2013; CHIARADIA *et al.*, 2015; FEUSER *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2017; PERES *et al.*, 2015), microemulsão, interfacial ou policondensação interfacial (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A maioria dos monômeros compatíveis ao processo de polimerização em uma fase aquosa originam polímeros pouco biodegradáveis ou não biodegradáveis. Além disso, a presença de moléculas residuais no meio reacional, como o monômero, oligômeros, surfactante, dependendo da sua toxicidade, podem exigir uma purificação da suspensão coloidal. Como forma de contornar esse tipo de limitação, foram propostos métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados ao invés dos monômeros (REIS *et al.*, 2006).

Os métodos mais frequentemente adotados para produzir nanopartículas de polímeros biodegradáveis são a emulsificação-evaporação ou difusão do solvente, dupla-emulsão, nanoprecipitação e o procedimento de *salting-out* (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). Nanopartículas de PCL são preparadas, principalmente, por nanoprecipitação (deslocamento de solvente) ou miniemulsão-evaporação de solvente (HANS; LOWMAN, 2002).

Algumas técnicas de preparação de dispersões de nanopartículas a partir de polímero pré-formado serão descritas a seguir.

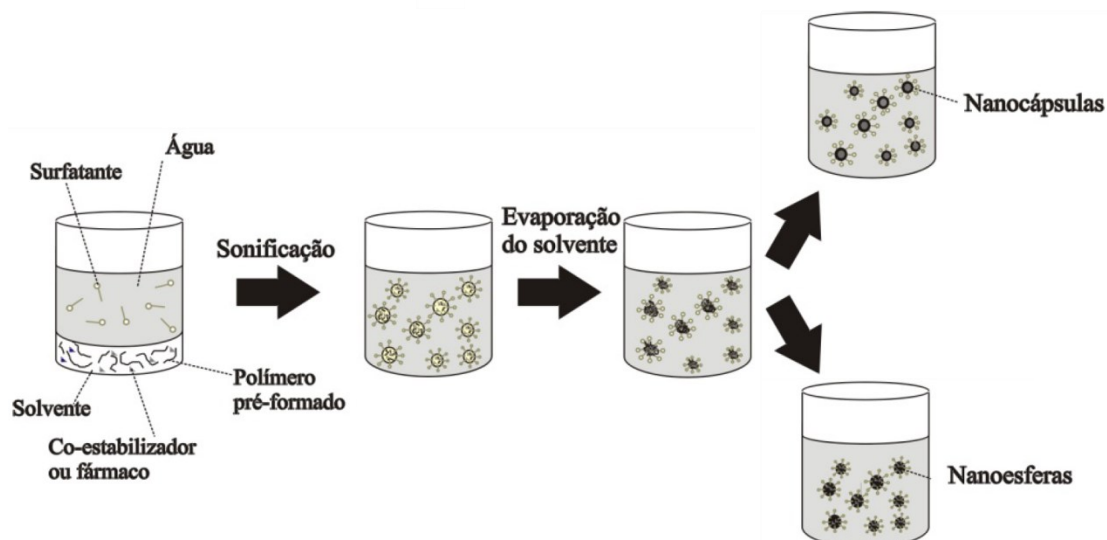
2.4.2.1 Emulsificação-evaporação do solvente e miniemulsificação-evaporação do solvente

A emulsificação-evaporação de solvente é o método mais utilizado para a preparação de nanopartículas poliméricas sólidas (HANS; LOWMAN, 2002; PASWAN; SAINI, 2017). Freitas, Merkle e Gander (2005) descreveram o processo da emulsificação-evaporação do solvente em três etapas principais. Primeiramente, a

fase orgânica, ou oleosa, é preparada com a dissolução do polímero pré-formado, juntamente com os demais componentes (coestabilizador, fármacos ou outros aditivos) em um solvente orgânico volátil e imiscível em água. Em seguida, a fase orgânica é emulsificada em uma fase aquosa contendo surfactante hidrofílico, para formar uma dispersão não estável de gotas com tamanhos na faixa de 1-10 μm (micrométricas) (REIS *et al.*, 2006). Por fim, o solvente orgânico é evaporado com a elevação da temperatura ou redução da pressão, induzindo a precipitação das nanopartículas poliméricas na fase aquosa.

A miniemulsificação-evaporação do solvente é uma variação dessa técnica obtida quando um equipamento de dispersão de alta eficiência, como uma sonda ultrassônica ou um homogeneizador de alta pressão, é utilizado na etapa de emulsificação das fases orgânica e aquosa (Figura 9). Nesse caso, o alto cisalhamento leva à formação de nanogotículas monodispersas na faixa de tamanho de 30–500 nm (submicrométricas), por definição, uma miniemulsão (LANDFESTER, 2001). O polímero é distribuído homogeneamente em todas as gotas, precipitando na forma de nanopartícula com a diminuição da solubilidade do polímero no meio, durante a etapa de evaporação do solvente (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008).

Figura 9 - Esquema representativo do método de miniemulsificação-evaporação de solvente.



Fonte: Leimann *et al.* (2013).

O tamanho das gotas precursoras das nanopartículas, submicrométrico ou micrométrico, constitui a principal diferença entre os métodos de miniemulsificação ou emulsificação com evaporação do solvente, respectivamente.

Para aumentar a estabilidade coloidal da miniemulsão são adicionados dois componentes: o surfactante e o coestabilizador. O surfactante minimiza a coalescência das gotas e a agregação de nanopartículas, através de estabilização eletrostática e/ou estérica. Já o coestabilizador tem a função de neutralizar a pressão de Laplace proveniente dos diferentes tamanhos de gota da miniemulsão, evitando a transferência de massa das gotículas menores para as maiores, processo conhecido como Ostwald ripening, ou degradação difusional. O coestabilizador é adicionado na fase dispersa e é importante que seja o componente mais hidrofóbico da formulação, para não difundir na fase aquosa e eficientemente evitar a agregação (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; LANDFESTER, 2001; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008).

O fornecimento de energia para gerar as nanogotas da miniemulsão possibilita trabalhar com uma ampla faixa de teor de polímero, ou seja, com soluções poliméricas de baixa ou alta viscosidade (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). Por essa razão, as formulações podem conter uma relação polímero/solvente orgânico maior e uma menor quantidade de solvente para a solubilização do polímero nas nanogotas (LEIMANN, 2011).

O tamanho das nanopartículas poliméricas pode ser controlado pelo ajuste da energia adicionada na etapa de miniemulsificação, tipo e quantidade de surfactante, viscosidade das fases orgânica e aquosa, concentração de polímero no solvente orgânico e temperatura (TRIERWEILER, 2009). E, a depender da quantidade de coestabilizador na formulação, pode-se produzir tanto nanocápsulas como nanoesferas (REIS *et al.*, 2006).

Do ponto de vista econômico, a utilização da água como não-solvente ou dispersante, simplifica e diminui os custos do processo, elimina a necessidade de reciclo e facilita a lavagem para a remoção de impurezas, quando necessário (REIS *et al.*, 2006). No entanto, a demanda de energia requerida para a homogeneização pode ser um fator limitante para a ampliação de escala (AGNER *et al.*, 2017). Além disso, ambos os métodos apresentam melhores resultados na encapsulação de bioativos de natureza hidrofóbica (HANS; LOWMAN, 2002).

Musyanovych *et al.* (2008) prepararam nanopartículas dos polímeros biodegradáveis, PLA, PLGA e PCL com elevado teor de sólidos através da miniemulsificação-*evaporação*, utilizando o clorofórmio como solvente. Quando avaliados diferentes surfactantes hidrofílicos, o trabalho concluiu que os iônicos com baixa massa molar, como o aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), apresentaram maior efeito estabilizante quando comparados a surfactantes não-iônicos (Lutensol e Pluronic), produzindo partículas com diâmetros médios menores e distribuições mais estreitas. Quando avaliada a influência da massa molar do PCL ($M_w = 115$ kDa e $M_w = 65$ kDa), a maior massa molar levou a formação de nanopartículas um pouco maiores, 165 nm e 139 nm, mas não apresentou influência na polidispersão ($PDI = 0,14$). Com relação a cinética de absorção das nanopartículas por linhagens celulares, quando comparadas a nanopartículas de poliestireno da mesma faixa de tamanho, as nanopartículas de PCL foram endocitadas 14 vezes mais rapidamente. Os autores sugerem que esse resultado deve ser analisado mais detalhadamente em experimentos futuros, mas que poderia estar relacionado a um mecanismo diferenciado de absorção celular de partículas biodegradáveis, envolvendo algum receptor que mediasse a internalização de maneira mais rápida.

2.4.2.2 Dupla emulsão-*evaporação* de solvente

A dupla, ou múltipla, emulsão com *evaporação* do solvente tem como principal benefício a incorporação de compostos hidrofílicos com elevada eficiência de encapsulação, contornando a limitação da técnica de emulsificação-*evaporação* (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). Nesse método, uma droga hidrofílica e um surfactante são dissolvidos em água. A emulsão primária é preparada por dispersão da fase aquosa em um solvente orgânico contendo um polímero dissolvido. Essa é então emulsificada em uma fase aquosa externa também contendo estabilizador. Por fim, o solvente é evaporado pelo aumento da temperatura ou redução de pressão. Nesse método, o depósito de uma membrana polimérica durante a primeira emulsão água em óleo impede a difusão da droga para o meio aquoso externo (HANS; LOWMAN, 2002).

2.4.2.3 Emulsificação-difusão do solvente

Nessa técnica, a fase orgânica é formada pelo polímero e o composto bioativos dissolvidos em um solvente parcialmente hidrossolúvel, mas saturado com água, para garantir o equilíbrio termodinâmico inicial. Ela é emulsionada na fase aquosa contendo estabilizador, para evitar a agregação das gotas. Após a adição de um grande volume de água à emulsão óleo em água, sob agitação branda, o equilíbrio do sistema muda, induzindo a difusão do solvente das gotas para a fase aquosa. Isso resulta na redução da solubilidade do polímero (precipitação) e subsequente formação das nanocápsulas ou nanoesferas, de acordo com a razão óleo/polímero. Por fim, o solvente orgânico pode ser eliminado por evaporação ou filtração, dependendo do seu ponto de ebulição, ou as partículas coletadas por centrifugação (HANS; LOWMAN, 2002; MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2006; REZENDE *et al.*, 2003).

A técnica de emulsificação-difusão do solvente apresenta como vantagens a possibilidade da utilização de solventes não clorados e potencialmente menos tóxicos, como acetato de etila e carbonato de propileno, obtenção de alta eficiência de encapsulação para fármacos lipofílicos e alta reprodutibilidade. No entanto, apresenta como desvantagens a necessidade de um grande volume de água para a difusão do solvente (aproximadamente 4 vezes o da emulsão) e a solubilidade parcial do solvente em água é um limitante do processo (MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008; PERES, 2012; REIS *et al.*, 2006)

Moinard-Chécot *et al.* (2008) desenvolveram nanocápsulas de PCL ($M_n = 80$ kDa) pelo método de emulsificação-difusão do solvente, utilizando acetato de etila como solvente e PVA como estabilizador. Foram testados diferentes óleos, para constituir o núcleo e a influência de vários parâmetros de formulação e processamento. Foi demonstrado que o tamanho das nanocápsulas (variando entre 360 e 700 nm) estava relacionado à composição química da fase orgânica e ao tamanho da emulsão primária. Como consequência, a maioria das propriedades das nanocápsulas foi determinada na etapa de emulsificação.

2.4.2.4 Deslocamento de Solvente (Nanoprecipitação) ou Deposição interfacial de polímero pré-formado

Nanoesferas e nanocápsulas também podem ser preparadas a partir do polímeros pré-formados através da nanoprecipitação (formulação sem óleo) ou deposição interfacial do polímero (contendo óleo) (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Nessas técnicas são utilizados dois solventes miscíveis entre si, sendo que o polímero, o composto bioativo e o óleo são solúveis em um deles (fase orgânica) e insolúveis no outro, geralmente a água. As nanopartículas formam-se instantaneamente quando a fase orgânica é adicionada sob agitação à fase dispersa e o polímero precipita devido a rápida difusão do solvente orgânico para a água (PERES, 2012; REIS *et al.*, 2006). Durante a precipitação o fármaco é incorporado a nanopartícula e o solvente pode ser removido por evaporação. Dentre os solventes orgânicos mais utilizados estão o etanol, a acetona e o hexano (HOLKEM *et al.*, 2015). Podem ser utilizados surfatantes tanto solúveis na fase aquosa quanto na fase orgânica (WEISS-ANGELI *et al.*, 2008).

Algumas vantagens podem ser destacadas, tais como: utilização de solventes orgânicos pouco tóxicos e em baixa quantidade; e, em alguns casos, possibilidade de obtenção de uma dispersão final de nanopartículas estável mesmo na ausência de surfactantes (PERES, 2012; TRIERWEILER, 2009)

A maior diferença entre a emulsificação-difusão de solvente e a nanoprecipitação é referente à solubilidade do solvente orgânico na fase contínua, que é parcial no primeiro caso e completa no segundo caso. A maior desvantagem da nanoprecipitação é a limitação pela solubilidade do polímero no solvente (LEIMANN, 2011).

PCL foi utilizado em diversos trabalhos para o preparo de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação, para encapsulação de tretinoína (OURIQUE *et al.*, 2008); octil metoxicinamato e quercetina, um filtro solar e um antioxidante respectivamente (WEISS-ANGELI *et al.*, 2008); hidrocortisona (CAZO *et al.*, 2012; ROSADO; SILVA; REIS, 2013); adapaleno com crodamol ou óleo de copaíba (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010), todos tratamentos relacionados a aplicação tópica.

2.4.2.5 *Salting-out*

O procedimento *de salting-out* é baseado na formação de uma emulsão do tipo óleo em água pela adição, sob agitação contínua, de uma solução aquosa contendo surfactante e saturada de eletrólito (substância *salting-out*), a uma fase oleosa, constituída de polímero pré-formado e composto bioativo dissolvido em um solvente ligeiramente miscível em água (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). A solução aquosa saturada impede o solvente de se misturar com a água por um processo *salting-out* (HOLKEM *et al.*, 2015). Posteriormente, é adicionada água até que o volume seja suficiente para permitir a difusão do solvente na água, o que resulta na formação de nanopartículas. Essa suspensão é purificada por filtração *cross-flow* (PERES, 2015).

ORGANIZADA

2.4.3 Administração tópica, nanotecnologia e tratamento da acne

A administração tópica de medicamentos possui um série de vantagens em relação às vias tradicionais, como a via oral, por promover liberação local, possibilitar o direcionamento de fármacos com baixa solubilidade oral, minimizar efeitos sistêmicos, eliminando uma primeira passagem hepática, e efeitos colaterais, que ocorrem quando o medicamento atua em locais não específicos (JUAN *et al.*, 2012). No entanto, a complexidade da pele e sua atuação como barreira biológica consolidam uma importante objeção à terapia tópica (ALMEIDA, 2014). Quando o estrato córneo está intacto e a barreira da pele não está comprometida, a penetração de fármacos é limitada e exclui muitos agentes terapêuticos potenciais (ROBERTS *et al.*, 2017). Dessa forma, a utilização de novas estratégias e tecnologias que viabilizem a administração tópica e transdérmica de bioativos tornou-se essencial para transpor a limitação descrita.

Nesse contexto, os nanocarreadores desempenham um papel importante no desenvolvimento de produtos mais eficazes para a administração de ativos na pele (tratamentos dermatológicos), através da pele (tratamentos transdérmicos) e cuidados ou proteção da pele (cosméticos). As nanopartículas poliméricas são um dos principais tipos de nanocarreadores utilizados para o desenvolvimento de nanomedicamentos para entrega tópica, além de nanopartículas lipídicas,

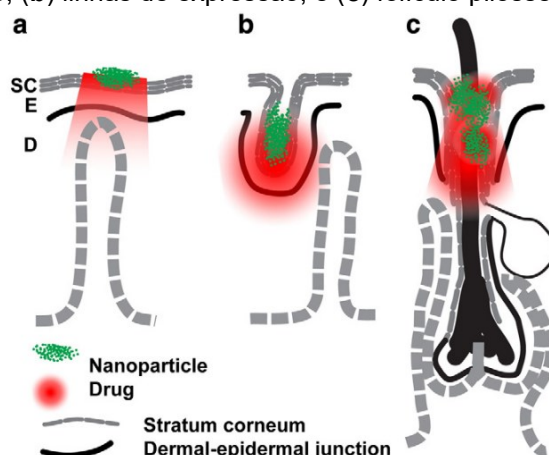
nanoemulsões, dentrímeros e lipossomos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JUAN *et al.*, 2012).

A utilização de materiais poliméricos para nanoencapsular substâncias ativas é uma abordagem importante por prover o controle de propriedades físico-químicas inerentes às moléculas, como coeficiente de partição, difusividade e solubilidade, que são estratégias para o aperfeiçoamento de formulações e direcionamento do ativo à camada da pele onde sua ação terapêutica é desejada (ALMEIDA, 2014; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004a).

As principais vantagens da utilização de nanopartículas sobre as formulações convencionais, como cremes, soluções e loções, estão relacionadas ao controle da liberação e ao aumento da penetração e do tempo de residência da substância biologicamente ativa na pele (ANTONIO *et al.*, 2014). O tamanho diminuto das partículas e elevada área superficial possibilitam um maior contato das moléculas incorporadas com o estrato córneo, promovendo sua permeação, além de facilitar a formulação de produtos dermatológicos e possibilitar uma aplicação confortável na pele (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Ademais, como citado anteriormente como uma potencialidade dos nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas podem proteger tanto o ativo incorporado, frente à degradação e volatilização, como a pele, prevenindo ou reduzindo reações de sensibilidade e irritação cutânea. Isso ocorre porque, usando um sistema tradicional contendo o fármaco na forma livre, sua administração às vezes é rápida e as concentrações tópicas podem resultar em efeitos colaterais. Enquanto para as nanopartículas, uma quantidade menor de medicamento é necessária devido a maior área superficial e a entrega direcionada. Essas características proporcionam um maior impacto terapêutico e maior adesão dos pacientes a tratamentos utilizando nanocarreadores direcionados a aplicação tópica (ANTONIO *et al.*, 2014; JUAN *et al.*, 2012).

A penetração cutânea de formulações, que deve transpor a barreira do estrato córneo, como descrito anteriormente, pode ocorrer por meio de três possíveis rotas: via intracelular, via intercelular ou via apêndice (folículos pilosos, folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas) (FILON *et al.*, 2015). A Figura 10 representa os 3 principais locais para o direcionamento de sistemas nanoestruturados: a superfície do estrato córneo, as linhas de expressão (dermatoglifos) e os folículos pilossebáceos (infundíbulo) (PROW *et al.*, 2011).

Figura 10 - Principais locais de entrega de fármaco através de sistemas nanoestruturados na pele. (a) Superfície do estrato córneo; (b) linhas de expressão; e (c) folículo pilosebáceo.

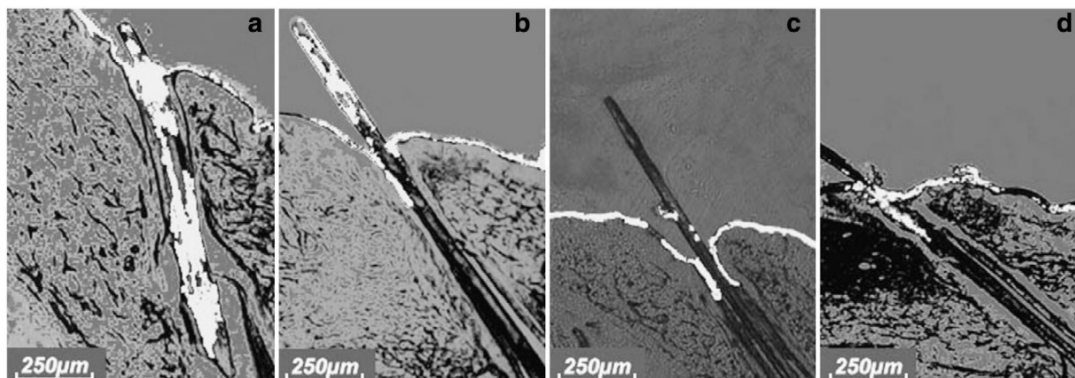


Fonte: Adaptado de Prow *et al.* (2011).

Schaefer e o grupo de pesquisa de Lademann mostraram que a via de penetração mais relevante para a entrega de ativos na pele é o folículo pilosebáceo e que esse atua como um importante reservatório de longo prazo de nanopartículas, enquanto a penetração via estrato córneo parece improvável. Em função disso, dedicam-se em estudar essa via de administração e possuem uma série de trabalhos publicados sobre o tema (JACOBI *et al.*, 2005; LADEMANN *et al.*, 2006, 2007, 2009, 2015; PATZELT; LADEMANN, 2020; ROLLAND *et al.*, 1993; SCHAEFER; LADEMANN, 2001; SCHAEFER; BLUME-PEYTAVI; STERRY, 2006). Diversos tipos de nanopartículas podem ser empregados para entrega de ativos via folicular, mas as nanopartículas poliméricas são os nanossistemas mais estudados para esse fim (FANG *et al.*, 2014).

Em outro estudo, Lademann e colegas investigaram o comportamento de penetração de nanopartículas de PLGA (320 nm) contendo corante e verificaram que as nanopartículas penetram mais profundamente nos folículos do que a forma não-particulada, quando uma massagem foi aplicada, simulando o movimento das hastes dos pelos (Figura 11). Além disso, o comportamento de armazenamento foi avaliado *in vivo*, em pele humana, e as nanopartículas permaneceram nos folículos por até 10 dias, enquanto a forma livre foi detectada por apenas 4 dias. (LADEMANN *et al.*, 2007). Uma vez que não penetrem através da epiderme, as nanopartículas são eliminadas com o tempo, através do fluxo natural de sebo (PROW *et al.*, 2011).

Figura 11 - Acúmulo de corante nos folículos pilossebáceos. Pele tratada com corante nanoparticulado (a) e corante não particulado (b) com massagem. Pele tratada sem aplicação de massagem com corante nanoparticulado (c) e corante não particulado (d).



Fonte: Adaptado de Lademann *et al.* (2007, 2009) e Prow *et al.* (2011).

Estudo similar foi realizado por Alvarez-Román *et al.* (2004) com nanopartículas de PCL contendo um ativo hidrofóbico (255 nm), e também foi identificado aumento significativo da penetração e concentração do ativo nas camadas mais profundas do folículo, em comparação com uma formulação não particulada na mesma concentração. Os autores atribuíram esse efeito a elevada área superficial das nanopartículas, que facilita o contato da molécula encapsulada com o estrato córneo.

As glândulas sebáceas associadas aos folículos fornecem um alvo potencial para a distribuição de medicamentos antiacne e outras disfunções das glândulas sebáceas (JUAN *et al.*, 2012). Diferentes formulações de nanopartículas poliméricas foram preparadas para o tratamento tópico da acne, principalmente formulações com agentes antimicrobianos e retinóides, como adapaleno. Uma grande vantagem reportada por esses ensaios é a melhora da tolerabilidade aos retinóides, inferindo a proteção do ativo pela nanopartícula (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011).

Os primeiros experimentos de Schaefer e colegas com partículas de PLGA carregadas com adapaleno já mostraram o papel benéfico dos sistemas de entrega de fármaco particulados para administração intrafolicular e um tratamento mais bem sucedido para acne. Aplicando o sistema de entrega nanoparticulado (0,1% de adapaleno) em dias alternados, ou uma formulação 10 vezes menos concentrada (0,01%) todos os dias, os autores observaram uma atividade equivalente a aplicação diária de um gel aquoso de adapaleno (0,1%). Ainda, foi observada a diminuição da irritação, tanto em pele de coelho, como em voluntários humanos (ROLLAND *et al.*, 1993).

No que se refere ao tamanho das nanopartículas, até hoje, não existem evidências de que nanopartículas com tamanho superior a 40 nm penetrem além do folículo. (PATZELT; LADEMANN, 2020). Patzelt *et al.* (2011) investigaram nanopartículas com tamanhos variando entre 100 e 1000 nm, e nanopartículas de 300 a 600 nm penetraram mais profundamente nos folículos capilares, independente do material utilizado, indicando que a penetração dependeria mais do tamanho do que do material utilizado. No entanto, de acordo o artigo de revisão de Guterres, Alves e Pohlmann (2007), a maioria das nanopartículas poliméricas destinadas ao tratamento tópico apresentaram tamanhos entre 200 e 300 nm e também demonstram bons resultados de permeação). Ainda com relação ao tamanho, Handjani e Ribier (2001), sugeriram que nanopartículas com tamanho entre 50 e 500 nm e PDI em torno de 0,2 são preferíveis para tratamentos terapêuticos ou cosméticos via aplicação tópica.

Diversas características das nanopartículas podem influenciar a extensão de penetração e transporte desses sistemas através da pele. Além do tamanho, inclui-se a forma, carga, propriedades de superfície e estado de agregação. Além disso, o veículo utilizado para a aplicação na pele e as condições da pele, que pode estar com a barreira alterada ou inflamada, por exemplo, podem afetar o grau e a profundidade da penetração. Desse modo, uma vez que o potencial e as consequências da penetração de nanopartículas no tecido vivo ainda não foram determinadas conclusivamente, elas devem ser avaliadas caso a caso quanto a sua atuação e riscos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; LADEMANN *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2017).

Embora a aplicação de nanopartículas represente um campo emergente e promissor na área da dermatologia, e que uma vasta gama de nanossistemas estão em desenvolvimento e passando por testes clínicos avançados, relativamente poucos conseguiram uma tradução completa para a prática clínica devido à necessidade de uma rigorosa demonstração de segurança e eficácia. As agências reguladoras estão tomando medidas para avaliação toxicológica e farmacológica de novos produtos baseados em nanotecnologia. No entanto, pesquisas com o objetivo de elucidar melhor a penetração dos nanocarreadores, a liberação dos ativos, e suas interações com outras moléculas e entidades biológicas, são necessárias para facilitar a regulamentação desses promissores sistemas de entrega de fármaco (JUAN *et al.*, 2012; PATZELT; LADEMANN, 2020; ROBERTS *et al.*, 2017).

Resumidamente, a partir dessa revisão, foi apresentada reportada a demanda de novos tratamentos para a acne, e o β -cariofileno (β CP), foi identificado como um potencial agente antiacne, pois possui diversas atividades farmacológicas exploradas na literatura científica que também se relacionam ao desenvolvimento da doença. Além disso, foi demonstrado que a incorporação de ativos em nanopartículas poliméricas, especialmente de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, fornece diversas vantagens sobre sistemas de entrega convencionais. Ainda, segundo a literatura nanopartículas poliméricas, quando administradas topicamente, são capazes de formar um depósito nos folículos, melhorando a eficácia terapêutica de doenças de pele, inclusive a acne.

Considerando o estado da arte, a combinação do β CP com a nanotecnologia, a partir do desenvolvimento de nanopartículas de PCL, mostra-se como uma alternativa com grande potencial para a aplicação tanto como medicamento, como cosmético, visando o tratamento tópico da acne. Especialmente, em função da possibilidade de ação terapêutica multifatorial, e de entrega direcionada, controlada e prolongada do ativo no local de acometimento da doença, o folículo pilossebáceo. Além disso, a incorporação do β CP em nanopartículas pode melhorar sua biodisponibilidade e evitar sua oxidação e volatilização.

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foi utilizada poli(ϵ -caprolactona) (PCL) de duas massas molares numéricas médias: $M_n = 80$ kDa (Sigma-Aldrich) e $M_n = 12,5$ kDa (IP = 2,07, sintetizada para este trabalho), referenciados no texto como APCL e BPCL, respectivamente.

Para a polimerização da ϵ -caprolactona (Sigma-Aldrich) a enzima Novozym 435 foi gentilmente doada pela Novozymes Brasil. Diclorometano (DCM, P.A. 99,8%), etanol (EtOH, P.A. 99,8%) e acetona (ACT, P.A. 99,8%) foram adquiridos da Vetec Química (Brasil). E peneiras moleculares tipo 4Å (Sigma-Aldrich) foram utilizadas na reação e para conservar a umidade do monômero e da enzima.

Para preparação das dispersões de nanopartículas contendo o ativo β -cariofileno (β CF, pureza $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich) pelo método de miniemulsificação-evaporação do solvente, crodamol GTCC (Alpha Química) e óleo resina de copaíba (extraído, caracterizado e gentilmente cedido pelo prof. Dr. Valdir Veiga) foram utilizados como coestabilizadores. Clorofórmio (CHCl_3 , Vetec, P.A.) foi utilizado como solvente, dodecil sulfato de sódio (SDS, Vetec) como surfactante e água destilada como meio contínuo.

Acetonitrila (ACN) e tetrahidrofurano (THF) padrão HPLC, ambos J.T. Baker, foram utilizados para as análises de eficiência de encapsulação do β CF (HPCL) e massa molar do polímero (GPC), respectivamente. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Síntese de Poli(ϵ -caprolactona) por abertura de anel via enzimática

A síntese da Poli(ϵ -caprolactona) de menor massa molar (APCL) foi realizada por polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL) conforme adaptação de metodologia descrita por Beltrame *et al.* (2021) e Guindani *et al.* (2017). Previamente à síntese, ϵ -CL foi seca sob vácuo (0,1 bar) e 100 °C, durante 24 h e armazenada em dessecador sobre sílica e peneiras

moleculares de 4 Å. A enzima (Novozym 435) também foi seca a vácuo (0,4 bar) e 70 °C, durante 16 h e armazenada em dessecador sobre sílica e peneiras moleculares de 4 Å.

A reação foi realizada em sistema fechado, durante 2 h, a temperatura de 65°C (banho de óleo) e agitação magnética. Foi utilizado tolueno como solvente na proporção mássica 1:2 de solvente:monômero. Os teores de enzima e de peneira molecular foram fixados, respectivamente, em 5%_m e 1%_m em relação à massa de monômero. Após a polimerização, o material foi purificado por solubilização em diclorometano (DCM), seguida da separação das enzimas e peneira, por filtração. Em seguida, PCL foi precipitada em uma mistura de etanol (EtOH) e acetona (ACT) gelados, na proporção de 7:3. A proporção volumétrica de DCM e EtOH/ACT foi de 1:6. O polímero foi então filtrado e seco à temperatura ambiente, sob vácuo, até obter peso constante.

3.2.2 Massa molar da PCL

A Cromatografia por permeação em gel (GPC) foi realizada para determinar as massas molares médias da PCL. Foram analisadas soluções 0,5%_{PCL:THF}, preparadas diluindo 0,02 g do produto da síntese em 4 mL de THF e filtrando em filtro de nylon com diâmetro de poros de 0,45 µm. Um volume de 20 µL foi injetado em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC, modelo LC 20-A, Shimadzu), com três colunas Shim Pack GPC 800 Series (GPC 801, GPC 804 e GPC 807), também da Shimadzu. O THF foi utilizado como eluente com vazão de 1 mL.min⁻¹ a 40 °C. A calibração do equipamento foi realizada com padrões de poliestireno cujas massas molares variavam de 580 a 9,225 × 10⁶ g.mol⁻¹.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos (LCP), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), da UFSC.

3.2.3 Preparo dos sistemas nanoestruturados

As dispersões de nanopartículas foram obtidas através da técnica de miniemulsificação-evaporação do solvente. Tendo como base as formulações e

procedimentos utilizados por Musyanovych *et al.* (2008), Leimann (2011) e Peres (2012), foi realizado um estudo prévio variando algumas condições visando aprimorar as características da partícula para melhor aplicabilidade como ativo antiacne para tratamento tópico. O objetivo principal foi obter um tamanho de partícula entre 200 e 500 nm, que, de acordo com a literatura, é uma faixa de tamanho considerada segura para uso tópico e ideal para permeação via folicular (HANDJANI; RIBIER, 2001; LADEMANN *et al.*, 2011; PATZELT *et al.*, 2011; PATZELT; LADEMANN, 2020). O estudo prévio com os experimentos realizados para definir as formulações encontra-se detalhado no Apêndice C, apresentando as condições avaliadas e o resultado de diâmetro médio das gotas, das partículas e índice de polidispersão das formulações que apresentaram estabilidade, bem como a conclusão baseada nestes ensaios. Dentre as condições avaliadas estão: o tipo de surfactante (surfactantes não iônicos (Tween 80, Span 80, Pluronic, Lutensol AT11 e AT50), ou surfactante aniônico SDS); a concentração de surfactante e do coestabilizador Crodamol; uso de diferentes solventes (clorofórmio e diclorometano); a concentração de polímero, variando entre 3 e 6%_m em relação ao solvente para o APCL e entre 9 e 20%_m para o BPCL (devido à maior solubilidade do BPCL foi possível usar concentrações mais elevadas em comparação com o APCL); amplitude e tempo de sonificação; e a quantidade de fase orgânica.

A partir do estudo preliminar, foram definidas as formulações contendo apenas crodamol nomeada como **03-C** e **11-C**, para a nanopartícula com APCL e BPCL, respectivamente. As formulações com APCL (Tabela 1), foram numeradas de 01 a 08, e as com BPCL (Tabela 2) de 09 a 16. Com relação a incorporação do β CF, foram preparadas nanopartículas nas proporções mássicas de 50%_m (**02- β CF** e **10- β CF**) e 100%_m (**01- β CF** e **09- β CF**) em relação ao polímero. Além de formulações do β CF com crodamol (C) ou óleo de Copaíba (OC) nas proporções mássicas de 20, 50 e 100%_m de coestabilizador em relação ao polímero.

Tabela 1 - Formulações das dispersões coloidais preparadas pelo método de miniemulsificação-
evaporação do solvente com poli(ϵ -caprolactona) de 80 kDa (APCL), para encapsulação de β -
cariofileno (β CF).

	Dispersões	01 – β CF	02 – β CF	03 – C	04 – C/ β CF	05 – C/ β CF	06 – OC	07 – OC/ β CF	08 – OC/ β CF
Fase Orgânica	β -Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
	Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
	Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
	APCL					0,3 g			
	Clorofórmio					10 g			
Fase Aquosa	Água					24 g			
	SDS					0,7% ^b			

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero (%_{ativo/APCL}); ^b Porcentagem mássica em relação à
fase orgânica (solvente, polímero, β -cariofileno e crodamol ou óleo de copaíba) (%_{SDS/FO}).

Fonte: Autora (2021).

Tabela 2 - Formulações das dispersões coloidais preparadas pelo método de miniemulsificação-
evaporação do solvente com poli(ϵ -caprolactona) de 12,5 kDa (BPCL), para encapsulação de β -
cariofileno (β CF).

	Dispersões	09 - β CF	10 - β CF	11 - C	12 - C/ β CF	13 - C/ β CF	14 - OC	15 - OC/ β CF	16 - OC/ β CF
Fase Orgânica	β -Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
	Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
	Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
	BPCL					1,5 g			
	Clorofórmio					10 g			
Fase Aquosa	Água					24 g			
	SDS					0,7% ^b			

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero (%_{ativo/BPCL}); ^b Porcentagem mássica em relação à
fase orgânica (solvente, polímero, β -cariofileno e crodamol ou óleo de copaíba) (%_{SDS/FO}).

Fonte: Autora (2021).

Ambas as fases, aquosa e orgânica, foram preparadas separadamente e mantidas sob agitação magnética por 20 min, para a completa solubilização. Então, as duas fases foram unidas e mantidas sob agitação magnética por mais 30 min. A miniemulsificação das fases se deu com o uso da sonda de ultrassom (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W com ponta de 1/2”), com

amplitude de 70%, durante 2 min, em regime de pulso (30 s *on* e 10 s *off*) e em banho de gelo, para minimizar o aumento da temperatura. A miniemulsão foi transferida para um Erlenmeyer para a evaporação do clorofórmio, a temperatura de 40°C, sob agitação branda, durante a noite. Por fim, as dispersões coloidais foram recolhidas em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração à 4 °C.

3.2.4 Tamanho médio das nanopartículas

A determinação do diâmetro médio das partículas em intensidade (d_p), e do índice de polidispersão (PDI) foi realizada em equipamento Zetasizer Nano S, da Malvern Instruments, através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Sendo as análises realizadas no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As amostras foram preparadas diluindo as dispersões em água destilada para que a contagem de fótons das análises esteja na faixa de 200-500 k.s⁻¹. (NOBBMANN, 2015) As medidas foram realizadas em cubetas de vidro, à 25°C e com os valores determinados pela média de três medidas, obtidas a partir de 12 leituras. Os resultados de d_p e PDI iniciais estão expressos em valor médio \pm desvio padrão (σ) referentes a duplicatas ou triplicatas das dispersões.

3.2.5 Determinação do pH e estabilidade química das dispersões de nanopartículas

O pH dos sistemas coloidais foi determinado em um pHmetro (IonLab, modelo pHS-3E) previamente calibrado com soluções tampão padrão de pH 7,0 e 4,0, com precisão de $\pm 0,01$. As medidas foram obtidas inserindo o eletrodo de vidro (Kasvi, K38-1465) diretamente nas dispersões e aguardando a estabilização do valor. Os valores de pH inicial estão expressos em valor médio \pm desvio padrão (σ), referentes a duplicatas ou triplicatas das dispersões.

Para avaliar a estabilidade química das dispersões coloidais foram realizadas medidas de pH de acordo com o procedimento descrito acima, a cada 15 dias por um período de 3 meses.

3.2.6 Estabilidade física das dispersões de nanopartículas

Para avaliar a estabilidade estática das dispersões, foram realizadas medidas de d_p e PDI, conforme descrito no item 3.2.4, a cada 15 dias, durante 3 meses. Os valores foram analisados estatisticamente através de ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste Tukey, utilizando o software Past, para definir a partir de que dia o diâmetro e/ou o PDI das nanopartículas variaram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos valores iniciais, indicando uma possível desestabilização dos sistemas coloidais.

Adicionalmente foram realizados ensaios de estabilidade acelerada na temperatura de 25 °C, em centrífuga analítica (LUMiSizer®, LUM GmbH, Alemanha) a uma velocidade de rotação de 4000 rpm, simulando a ação acelerada da gravidade. Perfis de transmissão de luz foram registrados a cada 30 s, gerando o gráfico de impressão digital da amostra e definindo o índice de instabilidade, com base na alteração da luz transmitida através da amostra em função do tempo.

Três dispersões de cada polímero, uma de cada tipo de sistema, apenas com cariofileno (**02- β CF** e **10- β CF**), com crodamol (**05-C/ β CF** e **12-C/ β CF**) ou com óleo de copaíba (**07-OC/ β CF** e **15-OC/ β CF**), foram escolhidas a partir de suas características de tamanho, PDI, eficiência de encapsulação e tempo de estabilidade estática, para avaliar o comportamento de desestabilização a partir do gráfico de impressão digital e índice de instabilidade. Para esse ensaio o próprio látex, após evaporação do solvente foi analisado, sem diluições prévias, e o tempo de análise foi de 25 h. Por um período mais curto, 1,04 h, também foram analisadas amostras de todas as formulações com o teor de sólidos reduzidos a 0,2%_m, visando uma noção comparativa da estabilidade entre as diferentes formulações de um mesmo polímero, a partir do índice de separação (LUM GMBH, 2020).

3.2.7 Potencial Zeta

Os valores de potencial Zeta (PZ) foram determinados pela técnica de laser doppler velocimetria associada à microeletroforese. Essa análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), da

UFSC, em um Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern Instruments), acoplado a um titulador automático programado para variar o pH do meio entre 3 e 7. As análises foram realizadas a 25°C e as amostras foram preparadas reduzindo-se o teor de sólido das dispersões com água destilada para 0,2%_m.

3.2.8 Morfologia das nanopartículas

As amostras para análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, JEM 2100F, 100Kv) foram preparadas depositando uma gota das dispersões diluídas (teor de sólidos 0,5%_m), em grid de cobre recoberto com carbono (300 *mesh*). As amostras foram analisadas após secagem a temperatura ambiente por 24 h, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.2.9 Eficiência de Encapsulação do β -Cariofileno ($EE_{\beta CF}$)

A eficiência de encapsulação do β -Cariofileno nas nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação a partir de adaptações dos procedimentos de Faria (2014) e Pacheco (2014). O método consiste em submeter as dispersões coloidais à centrifugação por 30 min e 13400, em dispositivos de ultrafiltração de 0,5 mL constituídos de celulose regenerada, Amicon® (Millipore). Desse modo, passam pela membrana de 10 kDa os ativos livres, ou não encapsulados, e sua concentração é quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL).

A eficiência de encapsulação ($EE_{\beta CF}$) foi obtida através da Equação 1, relacionando a concentração de ativo incorporado ($C_{\beta CF, incorporado}$), obtida pela diferença entre a concentração teórica ($C_{\beta CF, Teórica}$) e a concentração de ativo livre ($C_{\beta CF, Livre}$), com a concentração teórica ($C_{\beta CF, Teórica}$), multiplicado por 100.

$$EE_{\beta CF}(\%) = \frac{C_{\beta CF \text{ Incorporado}}}{C_{\beta CF, Teórica}} \times 100 = \frac{C_{\beta CF, Teórica} - C_{\beta CF, Livre}}{C_{\beta CF, Teórica}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.9.1 Doseamento do teor de β -Cariofileno livre

A concentração de β -Cariofileno no ultrafiltrado ($C_{\beta CF, livre}$) foi determinada em cromatógrafo líquido LC-20^a HPLC (Shimadzu), equipado com coluna Supelcosil (250 x 4,5 mm, 5 μ m, Supelco) e uma pré-coluna do mesmo material LC-18 (20 x 4 mm, 5 μ m, Supelco), com detector UV (SPD-20^a, Shimadzu) e *setpoint* de 221 nm. Acetonitrila (ACN) constituiu a fase móvel isocrática, com vazão molar de 1 mL.min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 20 μ L e a temperatura do sistema 40 °C.

Os resultados de concentração das amostras do filtrado foram obtidos aplicando os valores das áreas dos picos do cromatograma (A) na equação da reta, obtida pela curva de calibração previamente elaborada, conforme Equação 2.

$$C_{\beta CF, livre} = \frac{A - Coef. Linear}{Coef. Angular} \times FD \quad (2)$$

Onde, o fator de diluição (FD) foi definido conforme a Equação 3, considerando a diluição das amostras em ACN.

$$FD = \frac{m_{filtrado} + m_{ACN}}{m_{filtrado}} \quad (3)$$

A concentração teórica do β CF, $C_{\beta CF, Teórica}$, nas formulações apenas com o ativo ou utilizando o crodamol foi calculada pela Equação 4 multiplicando a massa de β CF pela sua pureza de 93% e dividindo pela massa total da dispersão, que é o somatório da massa de todos os componentes, exceto o clorofórmio. O relatório da análise de cromatografia gasosa que expressa a pureza do ativo está no Anexo A.

$$C_{\beta CF, Teórico} = \frac{m_{\beta CF, formulação} \times 0,93}{m_{dispersão}} \quad (4)$$

Para as formulações contendo OC, o cálculo da concentração teórica de β CF na formulação ($C_{\beta CF, Teórica}$) incluiu um segundo termo na Equação 4. Esse termo considera 34% da massa de OC como β CF, de acordo com a composição do óleo (Equação 5). O relatório com a caracterização do OC encontra-se no Anexo B (VEIGA, 2020).

$$C_{\beta CF, Teórico} = \frac{m_{\beta CF, formulação} \times 0,93 + m_{OC, formulação} \times 0,34}{m_{dispersão}} \quad (5)$$

3.2.9.2 Correção para as dispersões conteúdo OC

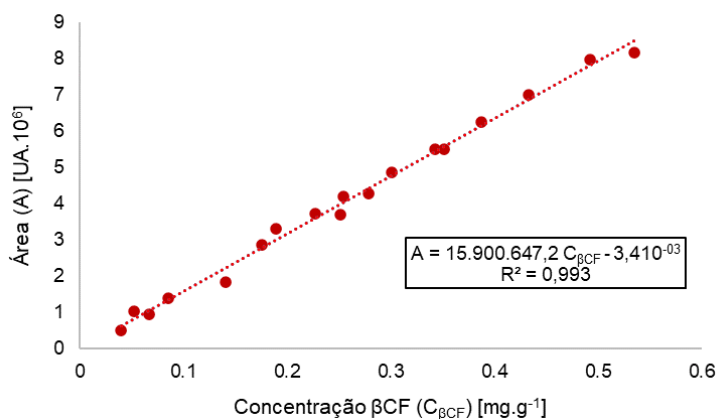
A Equação 5 expressa a concentração teórica real de β CF nas dispersões com OC, no entanto, o método utilizado não é específico para a identificação do β CF no óleo. Ou seja, através desse método, outros componentes presentes no OC são absorvidos no mesmo pico que o β CF e quantificados como tal. Isso é uma dificuldade quando se analisam óleos com componentes similares em sua composição. Por essa razão, ao fazer a análise do óleo puro através da metodologia descrita anteriormente (3.2.9.1), um teor de 66% do óleo foi identificado no mesmo tempo de retenção do β CF (Anexo C), enquanto sabe-se que ele possui apenas 34% de β CF em sua composição. Assim, a concentração de ativo livre, calculada pela Equação (2) fica superestimada e para calcular a real eficiência é necessário fazer uma correção na composição teórica, considerando 66% do ativo no óleo (Equação (6)).

$$C_{\beta CF, Teórico, Corrigida} = \frac{m_{\beta CF, formulação} \times 0,93 + m_{OC, formulação} \times 0,66}{m_{dispersão}} \quad (6)$$

3.2.9.3 Construção da curva analítica

A curva analítica relaciona a área do cromatograma, no eixo das ordenadas, com a concentração de β CF, no eixo das abscissas (Figura 12). Foram analisadas soluções com concentração variando entre 0,05 e 0,5 mg.g⁻¹ (n=18), preparadas a partir da diluição de uma solução mãe na concentração de 5,2 mg.g⁻¹ de β -cariofileno em acetonitrila. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R²) estão representados no gráfico. A linearidade dos dados foi identificada, uma vez que as áreas são diretamente proporcionais à concentração do ativo, com R² igual a 0,993. De acordo com normas da ANVISA (2003), coeficientes maiores que 0,99 caracterizam linearidade e indicam que a curva analítica pode ser utilizada para predição de valores experimentais. Ademais, o valor do coeficiente linear, ou intercepto, foi avaliado estatisticamente e não apresentou valor significativo em relação a hipótese nula (0,0) a um grau de significância de 5%, portanto a equação é válida e o coeficiente é mantido.

Figura 12 - Curva padrão para quantificar o teor de β -Cariofileno.



Áreas obtidas por HPCL, n=18.
Fonte: Autora (2021).

3.2.10 Propriedades Térmicas

O estudo térmico foi realizado na Central de Análise do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, da UFSC, em um Calorímetro Diferencial de Varredura 4000 (DSC Jade, Perkin Elmer), com amostras de aproximadamente 6 mg das nanopartículas liofilizadas e dos polímeros secos (APCL e BPCL). A análise ocorreu em atmosfera inerte (20 mL.min⁻¹), com temperatura variando de -10 a 100 °C, para nanopartículas contendo crodamol, e 0 a 100 °C, para as demais. Primeiramente, o histórico térmico das amostras foi removido a uma taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ e taxa de resfriamento de -10 °C.min⁻¹. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um segundo aquecimento a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

Os termogramas foram analisados utilizando o software Pyris. Para cada amostra, foram determinadas a temperatura de fusão (T_f) e a variação da entalpia de fusão (ΔH_f), a partir do segundo aquecimento, e a temperatura de cristalização (T_c) e variação da entalpia de cristalização (ΔH_c), no resfriamento.

Nanopartículas brancas foram sintetizadas conforme metodologia descrita no item 3.2.3, sem a inserção de β -cariofileno, crodamol ou óleo de copaíba, para realizar comparações no estudo térmico com as nanopartículas carregadas e com o polímero puro.

Para a liofilização, 2 mL das dispersões de nanopartículas foram congeladas a -20 °C, e, posteriormente, liofilizadas (L101, Liotop, Brasil) por 48 h.

3.2.11 Atividade Antimicrobiana

Os ativos β CF, óleo de copaíba e as dispersões **12-C/ β CF** e **15-OC/ β CF**, foram avaliados quanto sua ação antimicrobiana para a bactéria *Propionibacterium Acnes* (*P. acnes*). As dispersões, cada uma com um coestabilizador (OC ou crodamol) foram escolhidas por sua maior estabilidade, concentração e eficiência de encapsulação do β CF.

A metodologia utilizada foi a microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standard Institute*, CSLI M11-ED9:2018, com modificação do meio de cultura, para favorecer o crescimento bacteriano (CEBRIÁN *et al.*, 2018; CLSI, 2018). Os ensaios foram realizados em triplicata, seguindo o procedimento descrito com mais detalhes a seguir, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

3.2.11.1 Obtenção da linhagem bacteriana

Foi utilizada uma cepa de *P. acnes* (*Cutibacterium acnes*, ATCC® 6919™) pertencente à coleção da Fundação André Tosello (FAT), Campinas, SP. A cepa foi mantida sobre criopreservação a -80°C, em ultrafreezer, até sua utilização para os ensaios de atividade antimicrobiana.

Seguindo a recomendação da FAT, foram utilizados o meio de cultura Reinforced Clostridium Medium (RCM) e Reinforced Clostridium Agar (RCA), ambos da Merck.

3.2.11.2 Reativação da cepa

Após ser removida do ultrafreezer a cepa foi reativada em caldo RCM, e incubada por 48 h, à 37°C. A viabilidade e pureza da linhagem foram avaliadas a partir da diluição seriada e plaqueamento em meio ágar (RCA) de um repique do cultivo de reativação, verificando se apenas a bactéria de interesse havia crescido na placa. O

cultivo em meio RCA foi realizado semeando e estriando uma amostra de 10 µL do meio de cultivo e foi incubado por 48 h, à 37°C.

3.2.11.3 Padronização do inóculo

Inóculos bacterianos foram preparados pelo método de suspensão de colônia. Para tal, aproximadamente 5 colônias bem isoladas e com tamanhos aproximados, provenientes do cultivo em ágar foram suspensas em tampão fosfato salino estéril, PBS, até obtenção de turbidez correspondente a 0,5 da escala McFarland, que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹). Em seguida, foi feita uma diluição de 1:10 em PBS para se obter uma concentração de células bacterianas de 10^7 UFC.mL⁻¹.

O padrão de turbidez de 0,5 McFarland foi preparado a partir da união de 0,5 mL de cloreto de bário (BaCl₂) a 1,175% m/v com 99,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1% v/v. Em leitura em espectrofotômetro, o padrão deve apresentar absorvância entre 0,08 e 0,13 a 625 nm.

3.2.11.4 Soluções dos agentes antimicrobianos

Para preparar as soluções do óleo de copaíba e βCF pesou-se 0,1 g em balões volumétricos de 5 mL, acrescentou-se 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, 10% v/v) e 0,5 g Tween80® (10% m/v). O balão foi aferido com caldo RCM, obtendo uma concentração final de 20 mg.mL⁻¹.

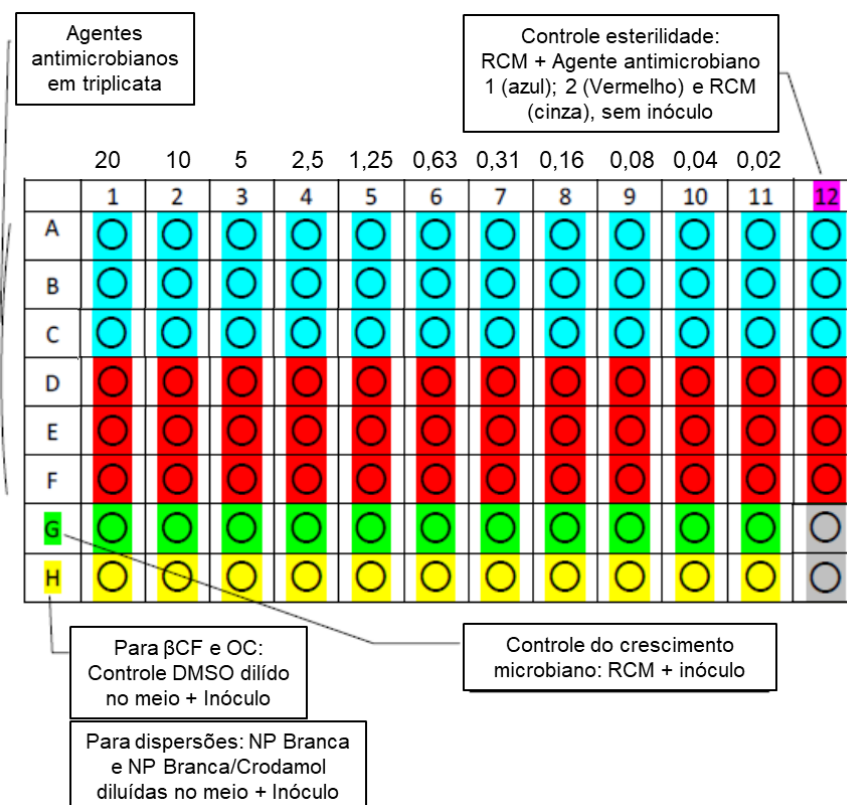
Para as soluções das dispersões de nanopartículas contendo o ativo, em balão volumétrico de 5 mL, foi pesada a massa de dispersão necessária para atingir a concentração de 20 mg.mL⁻¹, considerando a concentração de βCF nas mesmas, e o volume foi aferido com o meio RCM. Na formulação contendo OC a concentração de βCF também foi considerada.

3.2.11.5 Microplacas para o ensaio

A Figura 13 representa esquematicamente a montagem do ensaio de microdiluição em caldo e a concentração dos agentes antimicrobianos em cada

coluna. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços em forma de “U”, de poliestireno (CRALPLAS), com 12 colunas, numeradas de 1 a 12, e 8 linhas, nomeadas de A a H.

Figura 13 - Esquema da técnica de microdiluição em caldo RCM para teste da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (OC), β -cariofileno (β CF) e das dispersões de nanopartículas, frente à bactéria *P. Acnes*.



Fonte: Adaptado de Faria (2014).

Primeiramente, foram distribuídos em cada poço da microplaca 100 μ L de caldo RCM da coluna 2 a 11, nas linhas de A a G. Em cada placa foram testados dois agentes antimicrobianos (β CF, óleo de copaíba e as dispersões **12-C/ β CF** e **15-OC/ β CF**). Na coluna 1, nas linhas de A a C (azul), foram colocados 200 μ L da solução do agente antimicrobiano 1, e nas linhas D a F (vermelho) do agente antimicrobiano 2, ambos na concentração de 20 mg.mL⁻¹ dos componentes ativos.

Os poços da linha H (amarelo) foram utilizados como controle para verificar se os componentes utilizados para solubilizar os ativos e as dispersões ou os demais componentes das formulações poderiam interferir na atividade antimicrobiana. Portanto, para os ensaios dos agentes OC e β CF livres, foram adicionados 200 μ L de uma solução de meio RCM contendo 10% v/v de DMSO e 10% m/v de Tween80® .

Para os ensaios das dispersões, foram adicionados 100 µL das dispersões de nanopartículas brancas preparadas apenas com polímero e SDS na fase dispersa (**Np-Branca BPCL**), da coluna 1 a 6 e de nanopartículas com crodamol (**11-C**), da coluna 7 a 12. As dispersões utilizadas como controle foram diluídas em meio RCM para obter uma concentração de nanopartículas, e consequente, de polímero, surfactante e coestabilizador, equivalentes à concentração das dispersões utilizadas nos ensaios contendo os ativos antimicrobianos.

Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas, nas linhas A a F e H. O procedimento foi realizado retirando 100 µL da coluna 1 e transferidos para a coluna 2 e homogeneizados. O procedimento foi realizado de maneira sucessiva até a coluna número 11, da qual 100 µL foram retirados e descartados para igualar o volume de todos os poços. A Linha G foi utilizada como controle positivo para de crescimento microbiano, não recebendo soluções dos antimicrobianos livres ou dispersões contendo os agentes encapsulados.

Na última etapa do processo, 5 µL de inóculo, preparado conforme descrito no item 3.2.11.3 foram adicionados em todos os poços, exceto na coluna 12 que foi destinada para o controle da esterilidade das soluções analisadas. A diluição final do inóculo nos poços ficou na faixa de 5×10^5 UFC.mL⁻¹ ou 5×10^4 UFC por poço. Por fim, as microplacas foram incubadas por 48 h, em jarra de anaerobiose acrílica (2,5 L, Permution). As condições anaeróbias foram estabelecidas utilizando o gerador de atmosfera Anaerobac® (Probac, SP). Seguindo as indicações do fabricante, foram distribuídos 15 mL de água estéril sobre toda a superfície absorvente do gerador, e, posteriormente, foi incluída a fita indicadora, que, através da mudança da coloração azul para branca confirmava o ambiente anaeróbio.

3.2.11.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após as 48 h de incubação das placas, foi realizada a leitura para a definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Sendo definida como a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento da bactéria nos poços. A determinação foi feita a olho nu, comparando o crescimento entre os poços da mesma coluna nas linhas A-C (agente antimicrobiano 1) ou D-F (agente antimicrobiano 2) com a linha G (controle positivo).

3.2.11.7 Determinação Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O conteúdo dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano foi plaqueado em meio ágar (RCA) e encubado à 37 °C por 48 h. A concentração a partir da qual não houve crescimento bacteriano foi definida como a concentração bactericida mínima (CBM), indicando que o agente antimicrobiano eliminou as bactérias completamente.

3.2.12 Citotoxicidade

A atividade citotóxica do β CF e das dispersões **02- β CF**, **05-C/ β CF**, **10- β CF** e **12-C/ β CF** foi avaliada em duas linhagens celulares murinas, macrófago (RAW267) e fibroblasto (NIH3T3). Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste colorimétrico com o Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (MTT), seguindo a orientação da normativa da ISO 10993-05 (ISO, 2009). Esse ensaio consiste na avaliação da atividade da enzima mitocondrial desidrogenase, presente apenas em células metabolicamente viáveis. Essas enzimas são capazes de reduzir o sal tetrazólico (MTT), gerando cristais de formazan, de coloração roxa, tornando possível a quantificação espectrofotométrica da citotoxicidade induzida pelo composto em estudo (FERREIRA, 2018).

As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Eagle Modificado (DMEM), suplemento com 10% de soro bovino fetal (SBF), Penicilina (100 unidades.mL⁻¹), estreptomicina (100 mg.mL⁻¹) e glutamina (4 mM.L⁻¹), em garrafas de cultura celular de 25 mL e mantidas em estufa à 37°C, com 5% de CO₂, até atingir uma confluência de 80-90%. Todos os cultivos foram realizados à 37°C, com 5% de CO₂.

Para propósitos experimentais, as células foram tripsinizadas e cultivadas em microplacas de cultura de fundo plano de 96 poços, na concentração de 10⁴ células por poço, durante 24 h à 37°C, com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com os diferentes compostos, diluídos em meio DMEM, nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 μ g.mL⁻¹ de β CF e incubadas por mais 24 h.

Após a incubação das células, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 μ L da solução de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) em cada poço. A placa foi

incubada por 3 h, para permitir a reação de formação do formazan. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de 100 µL de DMSO por poço. A absorbância foi medida em 570 nm, utilizando um leitor de microplacas (Infanite 200, TECAN). Todos os reagentes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O cálculo da viabilidade celular (Viab) foi realizado pela Equação 7:

$$Viab(\%) = \frac{DO}{DO_c} \times 100 \quad (7)$$

Onde, DO é a média das leituras de densidades óticas obtidas para cada concentração avaliada e DO_c é a média das densidades óticas obtidas para o controle, constituído de células cultivadas sem amostras e com 1% de DMSO (concentração máxima utilizada para solubilizar o βCF).

Os resultados foram expressos como porcentagem média de sobrevivência ± desvio padrão (σ). Os dados foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste Tukey, utilizando o software Jamovi, para definir se ocorreu diminuição significativa (p<0,05) da viabilidade em relação ao grupo controle.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no laboratório de Fisiopatologia Experimental sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense em Criciúma - SC.

3.2.13 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do βCF e das dispersões **02-βCF**, **05-C/βCF**, **10-βCF** e **12-C/βCF** foi investigada utilizando o modelo inflamatório geral de macrófagos estimulados por lipossacarídeos (LPS). O LPS ativa vias inflamatórias nas células e induz a secreção de mediadores inflamatórios, como as interleucinas (IL), em função disso, a ação anti-inflamatória de compostos bioativos pode ser verificada a partir da inibição da expressão desses mediadores. A capacidade de compostos bioativos inibirem a expressão desses mediadores é uma maneira de caracterizar sua ação anti-inflamatória (FERREIRA, 2018).

Células RAW267, foram cultivadas na concentração de 10^4 células por poço em placa de cultura de fundo plano de 96 poços e incubadas durante 24 h à 37°C , com 5% de CO_2 . Após o período de incubação as células foram estimuladas com LPS ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubado por mais 2 h. Na sequência, o meio de cultura contendo LPS foi removido e os diferentes tratamentos foram adicionados nas concentrações de 2, 4, 8 e $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubados por 24 h. O controle negativo foi constituído de células estimuladas com LPS sem receber tratamento.

O sobrenadante foi subseqüentemente utilizado para quantificar os níveis das citocinas IL- 1β , IL-6 e IL-10, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Esse método é baseado em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Para isso, foram utilizados os kits ELISA correspondentes as citocinas (DuoSet® ELISA, R&D Systems , USA).

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (σ) e a análise estatística foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste Tukey com significância $p < 0,05$, utilizando o software Jamovi.

O ensaio imunoenzimático foi realizado no laboratório de Fisiopatologia Experimental sob coordenação do Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense em Criciúma - SC.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo contém os resultados obtidos para todas as dispersões de nanopartículas poliméricas, com o polímero de maior massa molar (APCL) e de menor massa molar (BPCL). A apresentação e discussão está subdividida por tipo de caracterização. Dentre as características físico-químicas que serão discutidas estão a distribuição do tamanho de partícula e pH, que também possibilitaram avaliar a estabilidade prolongada, por meio do acompanhamento ao longo de 90 dias. A estabilidade também será discutida em função do potencial Zeta, e da estabilidade acelerada. Ainda, os resultados de eficiência de encapsulação do ativo β CF, a morfologia e estudo térmico das nanopartículas serão abordados. Após as caracterizações físico-químicas, a potencial aplicabilidade dos nanossistemas como agentes terapêuticos antiacne será discutida, com base nos resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica. Os efeitos serão pautados, comparando os resultados obtidos para cada polímero, e em função das diferentes concentrações de β -Cariofileno, considerando os três tipos de sistemas propostos, na ausência de coestabilizador, ou na presença dos coestabilizadores, crodamol ou óleo de copaíba (OC).

4.1 Tamanho médio de partículas e pH iniciais das dispersões coloidais

As dispersões coloidais, obtidas a partir da técnica de miniemulsificação-evaporação do solvente, apresentaram diâmetros médios de partícula (d_p) dentro de uma faixa estreita, entre 178 e 220 nm, para todas as formulações propostas, tanto com APCL como BPCL (Tabela 3 e Tabela 4). Os nanossistemas obtidos podem ser considerados adequados para a aplicação tópica, segundo Handjani e Ribier (2001), que recomendam diâmetros entre 50 e 500 nm, e também estão de acordo com a faixa de tamanho de 200 a 300 nm, geralmente obtida para nanopartículas poliméricas biocompatíveis destinadas à distribuição cutânea. (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Ainda, os resultados de tamanho estão de acordo com trabalhos da literatura que também desenvolveram nanossistemas com PCL destinados ao tratamento da acne ou condições inflamatórias da pele, encapsulando ativos como

tretinoína, adapaleno, dapsona, hidrocortisona, ácido azelaico e óleos essenciais (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010; CAZO *et al.*, 2012; FLORES, 2011; KRAUTHEIM; GOLLNICK, 2003; OURIQUE *et al.*, 2008; PACHECO, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016; ROSADO; SILVA; REIS, 2013; TOIGO, 2015).

Outro parâmetro importante para caracterização dos sistemas coloidais é o índice de polidispersão (PDI), que variou entre 0,14 e 0,29, para as formulações desenvolvidas. Quanto menor o valor de PDI, mais estreita e homogênea é a distribuição dos tamanhos de partícula, proporcionando uma liberação de fármaco também mais homogênea. Apesar de alguns autores utilizarem nanocarreadores de fármacos com PDI menor que 0,30, dispersões de nanopartículas poliméricas com PDI menor ou igual a 0,20 são mais comumente aceitas como sistema de entrega e liberação controlada de fármaco (GOMEZGAETE *et al.*, 2007; HANDJANI; RIBIER, 2001; LOPALCO *et al.*, 2015). Considerando a última referência, apenas os sistemas **01- β CF**, **09- β CF**, **08-OC/ β CF** e **16-OC/ β CF** estariam fora da idealidade.

Tabela 3 - Efeito da composição das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL) no tamanho médio, índice de polidispersão e pH iniciais.

	01 βCF	02 βCF	03 – C	04 – C/βCF	05 – C/βCF	06 – OC	07 – OC/βCF	08 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
d_p^b (nm)	220 ± 3	190 ± 7 ^c	178 ± 1	187 ± 3 ^c	188 ± 6 ^c	189 ± 5	197 ± 3 ^c	210 ± 1
PDI^b	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01
pH^b	3,14 ± 0,06	3,05 ± 0,14 ^c	3,13 ± 0,03	3,09 ± 0,09	3,08 ± 0,01	3,21 ± 0,01	3,03 ± 0,02	3,09 ± 0,13

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%ativo/APCL); ^b Valor médio de duplicata (n=2); ^c Valor médio de triplicata (n=3).

Fonte: Autora (2021).

Tabela 4 - Efeito da composição das dispersões com o polímero de menor massa molar (BPCL) no tamanho médio, índice de polidispersão e pH iniciais.

	09 – βCF	10 – βCF	11 – C	12 – C/βCF	13 – C/βCF	14 – OC	15 – OC/βCF	16 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			

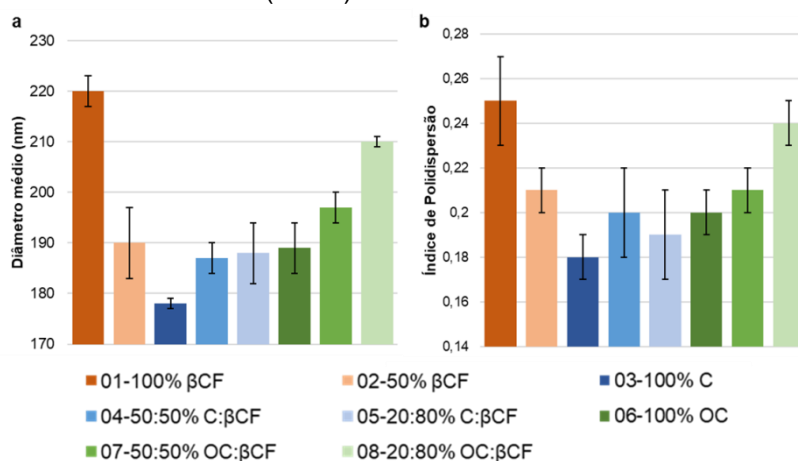
Óleo de Copaíba	100% ^a		50% ^a		20% ^a			
d_P ^b (nm)	219 ± 19 ^c	187 ± 14 ^c	175 ± 1 ^c	181 ± 9 ^c	193 ± 4	189 ± 12	195 ± 9 ^c	209 ± 4
PDI ^b	0,29 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,01
pH ^b	2,99 ± 0,12 ^c	2,91 ± 0,2 ^c	2,98 ± 0,03	2,99 ± 0,08 ^c	2,95 ± 0,05	2,94 ± 0,09	3,04 ± 0,08 ^c	2,93 ± 0,10

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo}/BPCL); ^b Valor médio de duplicata (n=2); ^c Valor médio de triplicata (n=3).

Fonte: Autora (2021).

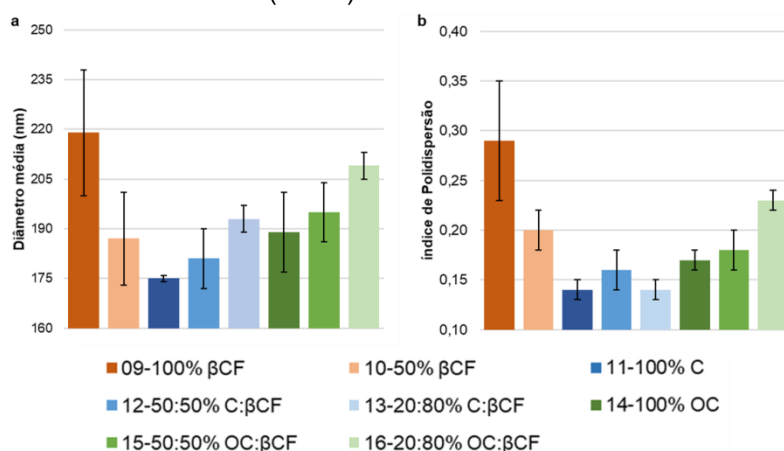
Para uma melhor visualização e discussão dos resultados, na Figura 14 e Figura 15 são apresentados gráficos de barras com os valores de d_P e PDI das formulações com APCL e BPCL.

Figura 14 - Efeito da composição no tamanho médio (a) e índice de polidispersão (b) das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL).



Fonte: Autora (2021).

Figura 15 - Efeito da composição no tamanho médio (a) e índice de polidispersão (b) das dispersões com o polímero de maior massa molar (BPCL).



Fonte: Autora (2021).

As dispersões de APCL e BPCL com a mesma proporção de ativos na fase dispersa, representadas com barras da mesma cor nas Figura 14 e Figura 15, apresentaram tamanhos muito similares. De acordo com Trierweiler (2009), os fatores que influenciam no tamanho das nanopartículas poliméricas são o ajuste da taxa de agitação, o tipo e quantidade de surfactante, a viscosidade das fases orgânica e aquosa, a concentração de polímero no solvente orgânico e a temperatura. Dentre esses fatores, o único que variou foi a concentração de polímero das formulações, que foi maior para o BPCL (15%_{FD}), devido à sua maior solubilidade no solvente, em relação ao APCL (3%_{FD}). Consequentemente, a viscosidade das fases orgânicas foi similar, possibilitando, com a mesma condição de sonificação, obter nanopartículas na mesma faixa de tamanhos.

Os maiores valores de d_p e PDI foram das nanopartículas **01- β CF** e **09- β CF**, com composição de 100% de β CF em relação ao polímero (100%_m β CF/PCL). Quando a concentração foi reduzida à metade (50% β CF/PCL), nas dispersões **02- β CF** e **10- β CF**, o diâmetro médio reduziu aproximadamente 30 nm e a homogeneidade no tamanho de partícula para ambos os polímeros melhorou, com PDI menor que 0,21. Isso pode ser atribuído à redução no teor de sólidos, que passou de 2,7%_m (**01**) para 2,1%_m (**02**) e de 11,5%_m (**09**) para 8,5%_m (**10**) nas formulações com APCL e BPCL, respectivamente.

Os sistemas contendo crodamol ou óleo de copaíba (barras azuis e verdes das Figura 14 e Figura 15) possuem o mesmo teor de sólidos que as dispersões **01- β CF** (2,7%_m) e **09- β CF** (11,5%_m), uma vez que também contém 100%_m de ativos em

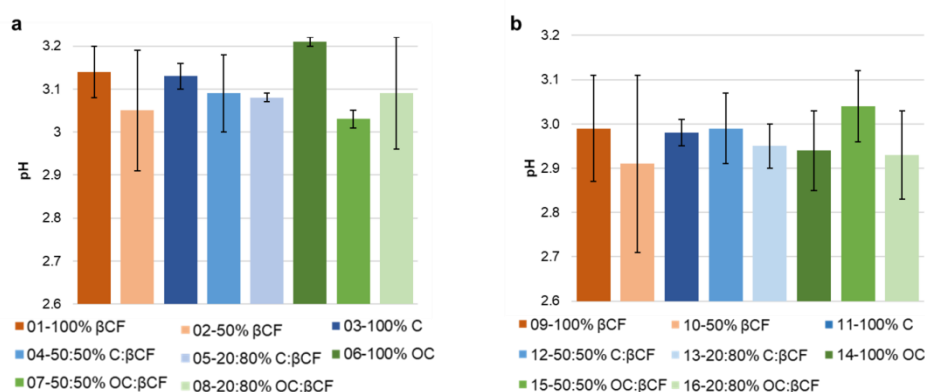
relação ao polímero, no entanto, o d_p e PDI obtidos foram expressivamente menores. Esse comportamento evidencia uma maior estabilização dos sistemas e atuação do crodamol e óleo de copaíba como coestabilizadores, minimizando a degradação difusional das gotas na miniemulsão e reduzindo o tamanho e o PDI das nanopartículas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; LANDFESTER, 2001).

Para as dispersões com mesma proporção mássica β CF:coestabilizador de um mesmo polímero (azul x verde), as com crodamol apresentaram diâmetros menores que as com óleo de copaíba. De acordo com a literatura, a natureza do núcleo oleoso de nanopartículas poliméricas influencia seu tamanho, desse modo, as diferentes características de viscosidades, hidrofobicidade e tensão interfacial do crodamol e do óleo de copaíba causaram as variações no diâmetro médio (BARRIOS, 2010; LOSA *et al.*, 1993; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; YU *et al.*, 1993).

Para as dispersões utilizando óleo de copaíba (verde), o aumento da quantidade de β CF na formulação, por substituição de parte do OC, aumentou o d_p e PDI de maneira proporcional (**06<07<08** e **14<15<16**), levando a uma distribuição mais larga ou heterogênea das formulações **08-OC/ β CF** e **16-OC/ β CF**, com 80% m_{β CF/PCL. No entanto, para as dispersões com crodamol (azul) o aumento do teor de ativo não provocou um efeito claro sobre os valores de d_p e PDI, e todos os sistemas apresentaram PDI inferior a 0,20.

Outra propriedade avaliada inicialmente foi o pH das dispersões poliméricas. Os valores estão listados nas Tabela 3 e Tabela 4, e representados em forma de gráfico de barras na Figura 16.**a** e **b**, para as formulações com APCL e BPCL, respectivamente.

Figura 16 - Efeito da composição no pH inicial das dispersões. (a) polímero de maior massa molar, APCL. (b) polímero de menor massa molar, BPCL.



Fonte: Autora (2021).

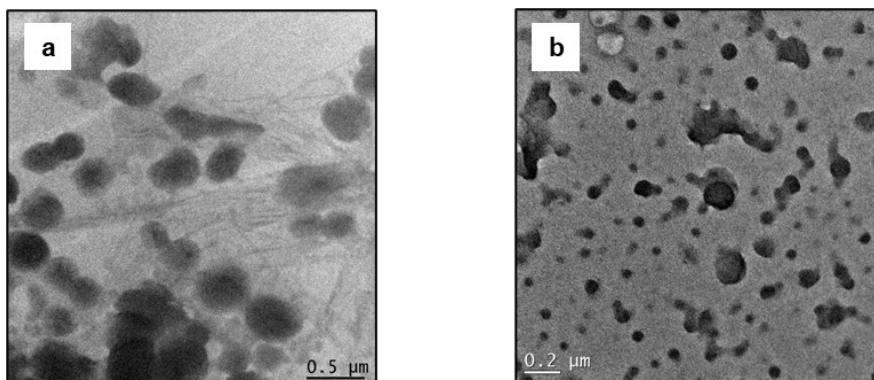
Todas as formulações apresentaram caráter ácido, com valor médio um pouco superior para as formulações com APCL, $3,10 \pm 0,05$, em relação as com BPCL, $2,96 \pm 0,05$. A variação da composição nos 3 tipos de sistemas propostos, apenas com βCF, crodamol ou OC, não causou influências claras no pH. Na literatura, o pH obtido para dispersões com PCL também possuem caráter ácido, porém, com valores em torno de 4-5, que pode ser atribuído a uma menor concentração de grupamentos carbonila, devido à menor concentração de polímero, quando comparado as formulações deste trabalho (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010; LEMOINE *et al.*, 1996; PACHECO, 2014).

4.2 Morfologia das nanopartículas

Imagens das nanopartículas foram obtidas a partir da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), possibilitando identificar sua morfologia. A exemplo das demais nanopartículas, foram analisadas as nanopartículas **05-C/βCF**, com o polímero de maior massa molar (APCL) e **12-C/βCF**, com o polímero de menor massa molar (BPCL), representadas na Figura 17.a e Figura 17.b, respectivamente. Foi possível verificar morfologia esférica para ambas as partículas, porém, com algumas deformações nas bordas e alguns borrões nas imagens. Essa deformação é comum para polímeros com baixa temperatura de fusão (T_f), como o PCL, sendo causada pelo feixe de elétrons do microscópio, que ao incidir sobre a amostra desfaz rapidamente as partículas, principalmente as menores, deixando as partículas maiores mais nítidas. Além disso, a fusão pode causar o aumento do diâmetro

aparente, pelo achatamento das partículas, e a união de algumas partículas, formando os borrões da imagem.

Figura 17 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão. (a) **05- C/βCF 20:80%** (APCL, amplificação 25 k). (b) **12- C/βCF 50:50%** (BPCL, amplificação 30 k).



Fonte: Autora (2021).

Na imagem das nanopartículas **05-C/βCF** (Figura 17.a), foi possível identificar partículas com diâmetro em torno de 200 nm, com bordas menos nítidas e coloração menos intensa, e em torno de 400 nm, com maior nitidez e intensidade. Enquanto por DLS, o tamanho médio em intensidade foi 196 ± 1 nm e o PDI igual a $0,20 \pm 0,01$. Conforme comentado anteriormente, o maior tamanho observado nas imagens pode estar relacionado a fusão e achatamento das partículas a partir do aquecimento proveniente do feixe de elétrons.

Já para as nanopartículas **12-C/βCF** (Figura 17.b), foram identificadas uma população majoritária de nanopartículas com tamanho menor, em torno de 100 nm, e algumas partículas maiores, com tamanho em torno de 200 nm. Em comparação com a imagem para o APCL (a), a distribuição está mais estreita, o que também corrobora com o menor PDI obtido por DLS, de $0,16 \pm 0,02$, e com o diâmetro médio, de 180 ± 2 nm.

4.3 Eficiência de Encapsulação das dispersões coloidais

Uma série de fatores podem influenciar na quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas e a quantidade de fármaco adicionada à formulação, o pH do meio, a

natureza do polímero e do tensoativo, além do método de preparo adotado (REZENDE *et al.*, 2003). Desse modo, as elevadas eficiências de encapsulação obtidas para todas as formulações, de ambos os polímeros (Tabela 5), inferem que o método e as características dos sistemas são eficientes para o desenvolvimento de nanocarreadores contendo β -cariofileno.

Tabela 5 - Efeito da composição das dispersões na eficiência de encapsulação (EE) do β -Cariofileno. (a) polímero de maior massa molar (APCL) na eficiência de encapsulação (EE) do β -Cariofileno.

a	01 βCF	02 βCF	04 – C/βCF	05 – C/βCF	06 – OC	07 – OC/βCF	08 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a	50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba					100% ^a	50% ^a	20% ^a
$C_{\beta CF}$, Teórica, Dispersão (mg.g⁻¹)	11,3	5,7	5,7	9,1	4,1	7,7	9,9
EE$_{\beta CF}$ (%)	97,4 $\pm 0,1^b$	99,0 $\pm 1,3^b$	96,4 $\pm 4,8^b$	99,4 $\pm 0,7^c$	81,7 $\pm 24,4^b$	99,7 $\pm 0,2^b$	99,7 $\pm 0,1^b$
b	09 – βCF	10 – βCF	12 – C/βCF	13 – C/βCF	14 – OC	15 – OC/βCF	16 – OC/βCF
$C_{\beta CF}$, Teórica, Dispersão (mg.g⁻¹)	51,5	26,5	25,8	41,2	18,8	35,2	45,0
EE$_{\beta CF}$ (%)	99,4 $\pm 0,5^b$	99,4 $\pm 0,7^b$	99,5 $\pm 0,6^c$	99,8 $\pm 0,1^b$	99,7 $\pm 0,2^b$	99,6 $\pm 0,1^c$	99,8 $\pm 0,2^b$

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo/PCL}); ^b Valor médio de duplicata; ^c Valor médio de triplicata.

Fonte: Autora (2021).

A eficiência de encapsulação foi superior a 99% para a maioria das dispersões e não foi possível identificar uma influência expressiva da massa molar do polímero nem das composições sobre a eficiência de encapsulação. As nanopartículas com BPCL apresentaram eficiências um pouco maiores (Tabela 5.b), sendo todas superiores a 99%, enquanto as com APCL (Tabela 5.a) apresentaram valores superiores a 96%, exceto para a **06-OC**, contendo apenas o óleo de copaíba em sua composição, com eficiência de 81,7%. Para essa formulação seria válido uma triplicata, uma vez que o desvio padrão foi elevado.

Resultados similares, com eficiências de encapsulação superiores a 80% foram obtidas por Leimann *et al.* (2015) e Peres *et al.* (2017), utilizando o método de

miniemulsificação-evaporação do solvente para encapsulação de progesterona e JVA (análogo hidrofóbico da isoniazida), em nanopartículas poliméricas de poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) e poli(L-ácido láctico) (PLLA), respectivamente. Pacheco (2014) também desenvolveu nanocápsulas de PCL carregadas com óleo de copaíba com eficiências superiores a 82%, no entanto, o método utilizado foi a nanoprecipitação. Em suas dispersões, a maior concentração teórica de óleo de copaíba foi de $0,05 \text{ mL.mL}^{-1}$, enquanto a **06-OC**, apenas com OC, é aproximadamente 80 vezes mais concentrada em óleo. O preparo de dispersões com maior concentração de polímero e ativo, quando comparado a outros métodos, é uma das vantagens da técnica de miniemulsificação-evaporação do solvente (MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). Por essa razão, as dispersões com BPCL possuem concentrações mais elevadas do ativo, uma vez que levam maior quantidade de polímero, quando comparadas as com APCL. No entanto, tendo em vista a aplicação como ativo antiacne, considerando a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do β CF, com registro na literatura de concentração inibitória mínima (CIM) entre 3,13 e $316 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e de atividade anti-inflamatória a partir de concentrações ainda menores, 2 e $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, todas as formulações possuem grande margem para diluição no preparo de um produto destinado ao tratamento tópico da acne. (GOREN *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2017; KOYAMA *et al.*, 2019; PETERLE *et al.*, 2020; SATO *et al.*, 1993; SCHMIDT *et al.*, 2006).

4.4 Estabilidade das dispersões coloidais

A estabilidade físico-química de sistemas coloidais é um fator importante a ser avaliado quando se deseja aplicá-los industrialmente, em produtos cosméticos ou farmacológicos, por exemplo. Por tratar-se de suspensões de partículas em meio líquido, geralmente aquoso, podem ocorrer fenômenos de desestabilização, como a sedimentação ou agregação do material disperso. Ainda, a liberação ou degradação dos componentes da formulação, tanto do polímero como dos ativos, durante o período de armazenamento, também interferem na estabilidade. Assim, para a investigação da estabilidade de sistemas coloidais poliméricos, os parâmetros físico-químicos geralmente monitorados são: o tamanho de partícula, o potencial zeta, a

distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Em vista disso, no presente trabalho, a estabilidade dos sistemas coloidais foi investigada a partir do monitoramento da distribuição do tamanho de partículas e do pH de dispersões conservadas sob refrigeração à 4 °C, durante 90 dias; pela avaliação do índice de separação nos ensaios de estabilidade acelerada; e pelo potencial Zeta, avaliado com a variação do pH. Os resultados estão resumidos na Tabela 6 e Tabela 7, para as formulações com APCL e BPCL, respectivamente, e serão discutidos separadamente nos três subitens a seguir.

Tabela 6 - Resumo dos resultados de estabilidade das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL).

	01 – βCF	02 – βCF	03 – C	04 – C/βCF	05 – C/βCF	06 – OC	07 – OC/βCF	08 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
Potencial Zeta^b	-10	-20	-50	-35	-20	-32	-50	-45
Variação do pH_{90 dias}^{c,f}	0,28	0,34	0,27	0,34	0,26	-0,01	0,02	0,04
Estabilidade Estática^{d,f} (dia)	<30	<60	≥90	<45	<75	≥90	≥90	<30
Índice de Separação^e	0,21 ± 0,02 ^g	0,32 ± 0,16 ^g	0,21	0,10	0,03 ± 0,02 ^h	0,29 ± 0,07 ^g	0,04	0,28 ± 0,05 ^g

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo/APCL}); ^b valor do PZ inicial, estimado a partir do ensaio com variação do pH; ^c pH_{inicial} – pH_{90 dias}; ^d dia em que ocorreu aumento significativo (p<0,05) de d_P e/ou PDI em relação aos valores iniciais; ^e ensaio de estabilidade acelerada realizado com amostras com o teor de sólidos de 0,2%_m; ^f n=1 ; ^g n=2.

Fonte: Autora (2021).

Tabela 7 - Resumo dos resultados de estabilidade das dispersões com o polímero de menor massa molar (BPCL).

	09 – βCF	10 – βCF	11 – C	12 – C/βCF	13 – C/βCF	14 – OC	15 – OC/βCF	16 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
Potencial Zeta^b	-10	-20	-20	-40	-30	-45	-40	-40

Varição do pH_{90 dias} ^{c,f}	0,27	0,27	0,30	0,28	0,10	0,01	-0,08	0,01
Estabilidade Estática ^{d,f} (dia)	<45	≥90	≥90	≥90	<60	≥90	<75	<75
Índice de Separação ^e	0,46 ± 0,09 ^g	0,51 ± 0,05 ^g	0,11	0,01 ± 0,004 ^g	0,10 ± 0,05 ^g	0,17 ± 0,006 ^g	0,15 ± 0,03 ^g	0,38 ± 0,02 ^g

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo/APCL}); ^b valor do PZ inicial, estimado a partir do ensaio com variação do pH; ^c pH_{Inicial} – pH_{90 dias}; ^d dia em que ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) de d_p e/ou PDI em relação aos valores iniciais; ^e ensaio de estabilidade acelerada realizado com amostras com o teor de sólidos de 0,2%_m; ^f n=1 ; ^g n=2.

Fonte: Autora (2021).

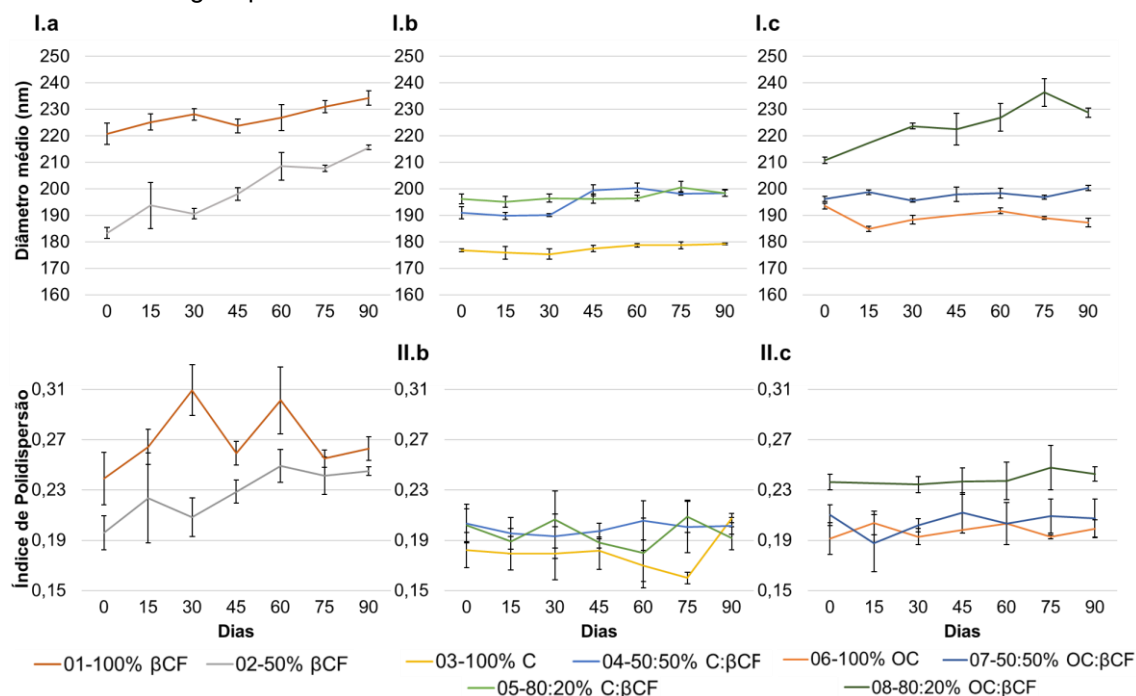
4.4.1 Estabilidade Física

4.4.1.1 Estabilidade estática

Os dados de estabilidade estática na Tabela 6 e Tabela 7, estão expressos em função do dia em que o tamanho e/ou o PDI da nanopartícula variou significativamente em relação ao seu valor inicial.

Para o polímero de maior massa molar (APCL), de acordo com a avaliação estatística, apenas as dispersões **03-C**, **06-C** e **07-OC/βCF** permaneceram com tamanho e PDI estáveis durante os 3 meses (Tabela 6). No entanto, observando os gráficos do acompanhamento de d_p e PDI, linhas I e II da Figura 18 as dispersões sem coestabilizador demonstraram maiores desestabilizações (coluna **a**). A formulação **02-βCF** (cinza), com 50%_{βCF/APCL}, apresentou o aumento mais expressivo de d_p , de 40 nm, e a **01-βCF** (laranja), com 100%_{βCF/APCL}, variou significativamente o valor de PDI no trigésimo dia de monitoramento, chegando em um valor de 0,31, indicando uma distribuição mais larga, com o surgimento de uma nova moda de tamanhos referente a partículas que se agregaram. A formulação com 80% de βCF e apenas 20% de OC em relação ao polímero, **08-OC/βCF** (coluna **c**, verde), também perdeu a estabilidade com menos de 30 dias. Esse comportamento pode estar relacionado a uma maior dificuldade de coestabilização do OC, quando comparado às dispersões com crodamol (coluna **b**) e à formulação **07-OC/βCF** (coluna **c**, azul), que, com uma maior concentração de OC (50%), permaneceu estável durante os 90 dias do ensaio.

Figura 18 - Gráficos representando o monitoramento do d_p (I) e PDI (II), durante 90 dias, das dispersões coloidais de APCL, apenas com β CF, **01- β CF** e **02- β CF** (a), ou na presença de crodamol (b) **03-C**, **04-C/ β CF** e **05-C/ β CF** ou óleo de copaíba (c) **06-OC**, **07-OC/ β CF** e **08-OC/ β CF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.

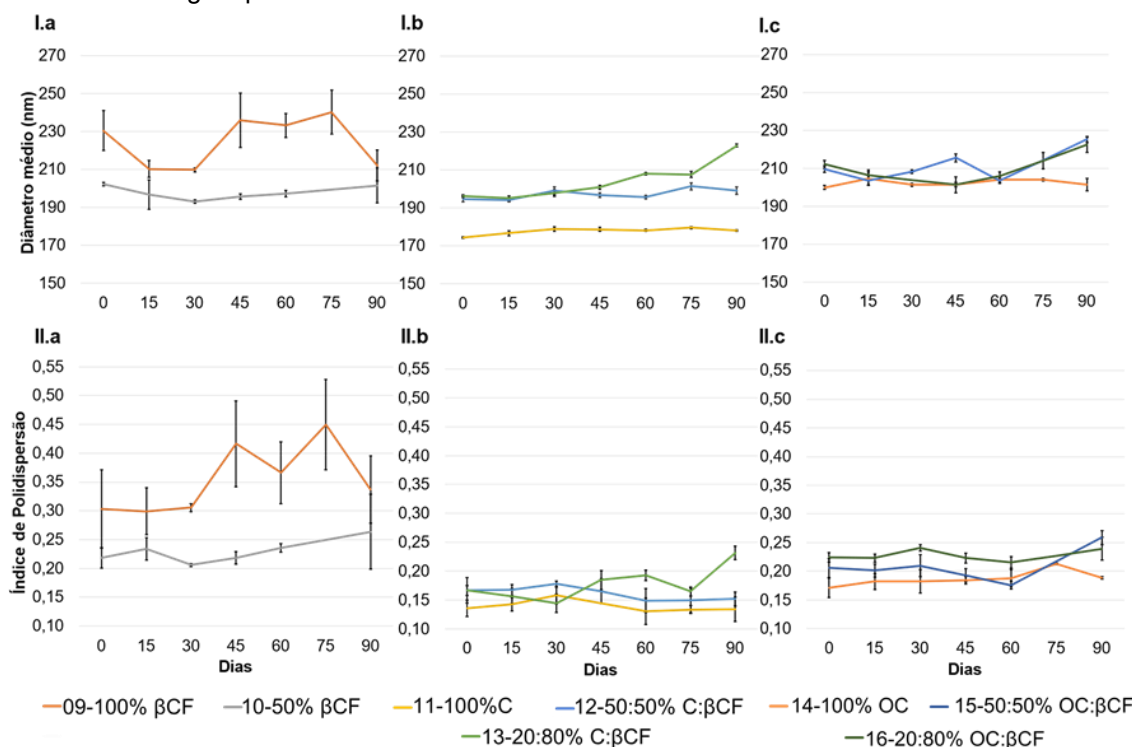


Fonte: Autora (2021).

A alteração na massa molar do polímero e o teor de sólidos entre as dispersões com APCL e BPCL não causou muita influência na estabilidade estática. Para as dispersões com BPCL, apenas a **10- β CF**, **11-C**, **12-C/ β CF** e **14-OC** mantiveram o valor de d_p e PDI significativamente iguais aos valores iniciais durante os 90 dias (Tabela 7). No entanto, observando os gráficos da Figura 19, referentes ao acompanhamento dos valores de d_p (I) e PDI (II), as maiores flutuações nos valores, especialmente em PDI (II), foram para a formulação **09- β CF**, contendo 100% β CF/BPCL e sem coestabilizador, que ocorreram a partir de 45 dias. Já para as formulações com crodamol (coluna b) ou óleo de copaíba (coluna c), os aumentos ocorreram a partir de 65 dias e não foram tão expressivos.

Figura 19 - Gráficos representando o monitoramento do d_p (I) e PDI (II), durante 90 dias, das dispersões coloidais de BPCL, apenas com β CF, **09- β CF** e **10- β CF** (a), ou na presença de crodamol (b) **11-C**, **12-**

C/βCF e 13-C/βCF ou óleo de copaíba (**c**) **14-OC**, **15-OC/βCF** e **16-OC/βCF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.



Fonte: Autora (2021).

Como exposto anteriormente, alterações no d_p ou PDI das nanopartículas ao longo do tempo podem ser indício de agregação, sedimentação, flotação, ou até mesmo a decomposição das mesmas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Nesse sentido, de maneira geral, com relação ao acompanhamento do tamanho de partícula, a presença dos coestabilizadores nas formulações resultaram em maiores estabilidades estáticas para ambos os polímeros.

4.4.1.2 Estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada é outra forma de avaliar a capacidade de uma dispersão permanecer inalterada frente a aplicação de uma força centrífuga. Essa avaliação foi realizada usando o equipamento LUMiSizer®, uma centrífuga analítica que emite luz na região do infravermelho próximo (NIR) através das amostras e registra os perfis de transmissão de luz durante a centrifugação (LUM GMBH, 2020).

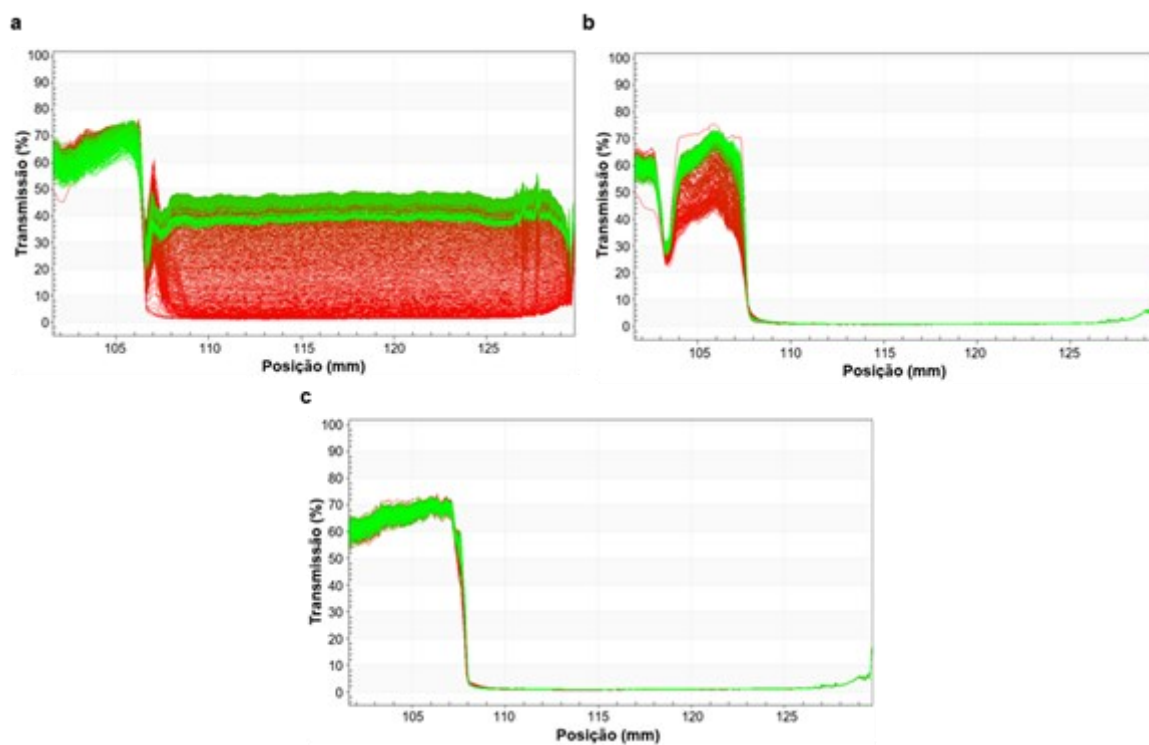
Quando uma suspensão é analisada sem diluição, a união desses perfis gera um gráfico denominado de impressão digital, uma vez que fornece informações sobre

a cinética do processo de separação e está intimamente relacionada à distribuição do tamanho das partículas (PEREIRA *et al.*, 2018).

O software da LUMiSizer® fornece ainda um parâmetro quantitativo, definido a partir dos perfis de transmissão, que permite comparar diferentes amostras em estudo, o índice de instabilidade ou separação (IS). Quando ocorre a desestabilização do sistema, devido à formação de creme, sedimentação, floculação, coalescência, aglomeração ou separação de fases, a luz transmitida através da amostra aumenta, causando maior separação dos perfis. Esse processo é chamado de clarificação e o índice de separação é calculado com base na clarificação em um determinado tempo de separação, dividido pela clarificação máxima. O índice de separação é um número adimensional e varia de 0 (mais estável) a 1 (mais instável) (LUM GMBH, 2020; ZIELIŃSKA *et al.*, 2018).

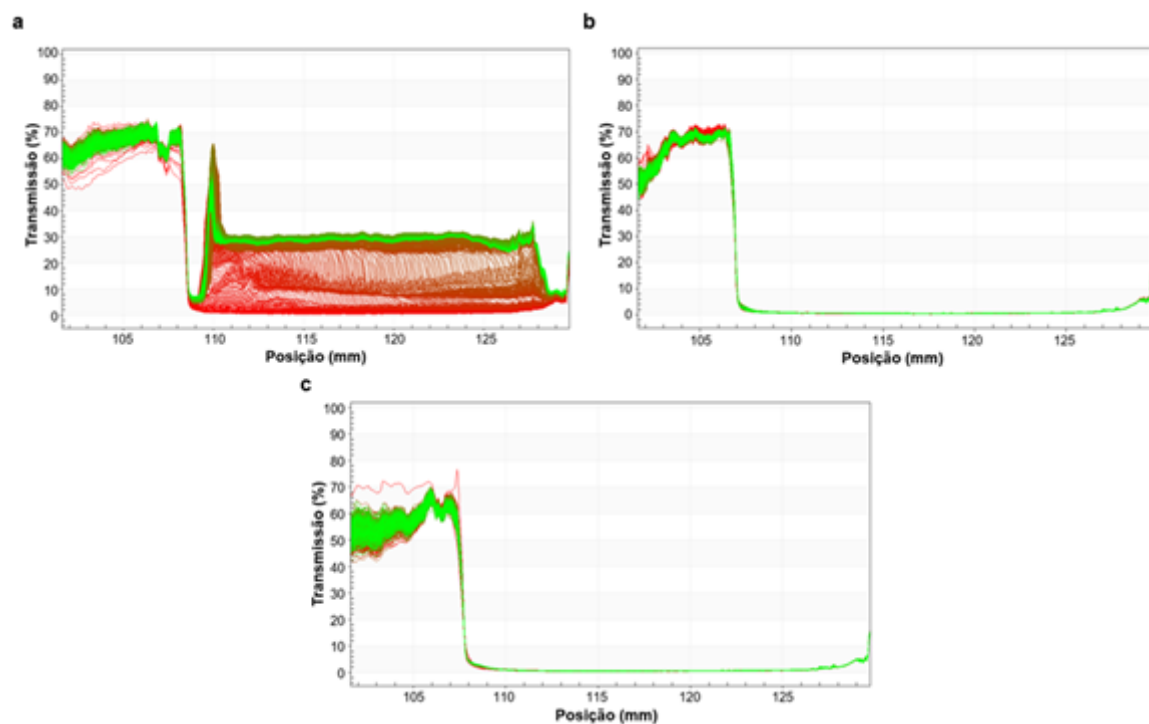
O ensaio para a obtenção do gráfico de impressão digital foi realizado para as três melhores formulações de cada polímero, sendo uma de cada tipo de sistema, apenas com cariofileno, com crodamol ou com óleo de copaíba, como coestabilizador. Para o APCL foram escolhidas a **02-βCF**, **05-C/βCF**, e **07-OC/βCF** (Figura 20), e para BCPL **10-βCF**, **12-C/βCF** e **15-OC/βCF** (Figura 21), de acordo com suas características de tamanho, PDI, eficiência de encapsulação e tempo de estabilidade estática.

Figura 20 - Gráficos de impressão digital para as dispersões com APCL. (a) **02-βCF**, IS = 0,43 (b) **05-C/βCF**, IS < 0,0001 e (c) **07-OC/βCF**, IS < 0,0001. Ensaio realizado com dispersões sem diluição prévia.



Fonte: Autora (2021).

Figura 21 - Gráficos de impressão digital para as dispersões com BPCL. (a) **09-βCF**, IS = 0,31 (b) **12-C/βCF**, IS < 0,0001 e (c) **15-OC/βCF**, IS < 0,0001.



Fonte: Autora (2021).

Nos gráficos de impressão digital, o eixo das abcissas representa a posição a partir do centro de rotação da centrífuga até o fundo da cubeta contendo a amostra, sendo o início da cubeta em torno de 108 mm, e no eixo das ordenadas é definida a porcentagem de luz transmitida através da amostra. Nos primeiros perfis de transmissão, representados em vermelho, a transmissão é nula para todos os gráficos, devido ao elevado teor de sólidos e aspecto leitoso das dispersões, que impossibilitam a passagem da luz. Para as dispersões contendo coestabilizador, de ambos os polímeros, gráficos **b** e **c**, da Figura 20 e da Figura 21, esse comportamento permaneceu até o fim do ensaio (25 h), indicando que essas formulações não desestabilizaram. Em função disso, não é possível calcular o índice de separação, uma vez que não ocorreu clarificação, e o software atribui $IS < 0,0001$ para esses sistemas.

No entanto, as dispersões apenas com o β CF, representadas no gráfico **a** da Figura 20 e da Figura 21, apresentam alteração nos perfis, aumentando a luz transmitida ao longo do tempo (perfis em verde). Conforme exposto anteriormente, através do gráfico de impressão digital é possível caracterizar o fenômeno de desestabilização e o tipo de dispersão característica. Desse modo, os perfis obtidos para as dispersões **02- β CF** e **10- β CF** são característicos de dispersões polidispersas e com comportamento misto de sedimentação e cremação. Nesse tipo de sistema, uma determinada moda de nanopartículas se desloca para o fundo, levando a um aumento da transmissão de luz na parte superior da cubeta e diminuindo na parte inferior, mais expressivo para **10- β CF**. Enquanto outra moda apresenta a tendência de se deslocar para cima, mantendo partículas dispersas ao longo de toda a cubeta, porém com a transmissão de luz sendo aumentada com o tempo (ZIELIŃSKA *et al.*, 2018).

Nesse caso, foi possível definir o IS, sendo o da dispersão **02- β CF** igual a 0,43, superior ao obtido para a **10- β CF**, 0,31, o que é esperado uma vez que a transmissão de luz final foi de 60% para a amostra **02- β CF** e 30% para a **10- β CF**. A menor transmissão de luz também pode estar relacionada ao maior teor de nanopartículas da **10- β CF** (8,5%_m) em comparação com a **02- β CF** (2,1%_m), o que dificulta a passagem da luz. Esse resultado também está de acordo com as medidas de estabilidade estática, uma vez que a **10- β CF** permaneceu com a distribuição do

tamanho de partículas constante durante 90 dias, enquanto a **02-βCF**, por menos de 60 dias.

Com o objetivo de obter uma noção comparativa da estabilidade acelerada entre as diferentes dispersões, considerando o longo período que seria necessário para desestabilizar os sistemas sem a diluição, foi realizada a análise por LUMSizer dos sistemas diluídos e por um menor tempo, para definir o IS. Os resultados obtidos serão discutidos em comparação com a análise de estabilidade estática, levando em consideração que o valor de IS se comporta de maneira inversamente proporcional a velocidade de perda de estabilidade dos sistemas, ou seja quanto menor o índice, menor a presença de fenômenos de desestabilização e vice-versa (LERCHE, 2019).

Os valores médios de IS para as dispersões com APCL e BPCL estão na Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente, e os gráficos de transmissão com todos os resultados no APÊNDICE B - Perfis de transmissão das dispersões .

Para os sistemas diluídos, os maiores índices de separação foram das dispersões sem coestabilizador, confirmando sua maior instabilidade. No entanto, a **10-βCF**, que pelo acompanhamento se manteve estável, não apresentou boa estabilidade dinâmica, com IS de $0,51 \pm 0,05$. Isso pode estar relacionado à temperatura de armazenamento durante o acompanhamento para definir a estabilidade estática, que foi em 4°C, enquanto o ensaio de estabilidade dinâmica foi realizado a 25°C, acelerando a desestabilização do sistema.

Como as amostras foram reduzidas a um mesmo teor de sólidos (0,2%_m), os resultados permitiram uma correlação entre as formulações com o mesmo polímero e com composições similares, alterando apenas o tipo de coestabilizador ou entre as diferentes proporções de um mesmo coestabilizador. Como exemplo, para as dispersões contendo 50:50 βCF:coestabilizador do APCL, a **04-C/βCF**, com crodamol, obteve IS de 0,10, superior a **07-OC/βCF**, com OC e IS de 0,04, e o tempo de estabilidade estática foi inversamente proporcional, sendo menor que 45 dias e maior que 90 dias, respectivamente. A outra correlação possível foi variando a proporção de ativo, para um mesmo coestabilizador. Como exemplo, para as dispersões com APCL contendo βCF:OC, a **07-C/βCF**, na proporção 50:50, obteve IS de 0,04, menor que a **08-OC/βCF**, com proporção 20:80 e IS de 0,28, com tempo de estabilização maior que 90 dias para a **07-C/βCF** e menor que 30 dias para **08-OC/βCF**. Se estendendo para todas as demais comparações dessa maneira. A única

situação que não ocorreu uma diferença no tempo de estabilização com relação aos diferentes IS foi entre a **15-OC/βCF** e a **16-OC/βCF**, em que ambas se mostraram estáveis por menos de 75 dias, porém o IS da **16-OC/βCF** foi superior ao da **15-OC/βCF**, o que mais uma vez pode estar relacionado à diferença de temperatura entre os ensaios.

Portanto, a análise de estabilidade acelerada pode ser uma boa forma para definir os melhores coestabilizadores e melhores proporções ativo:coestabilizador de formulações em um menor espaço de tempo.

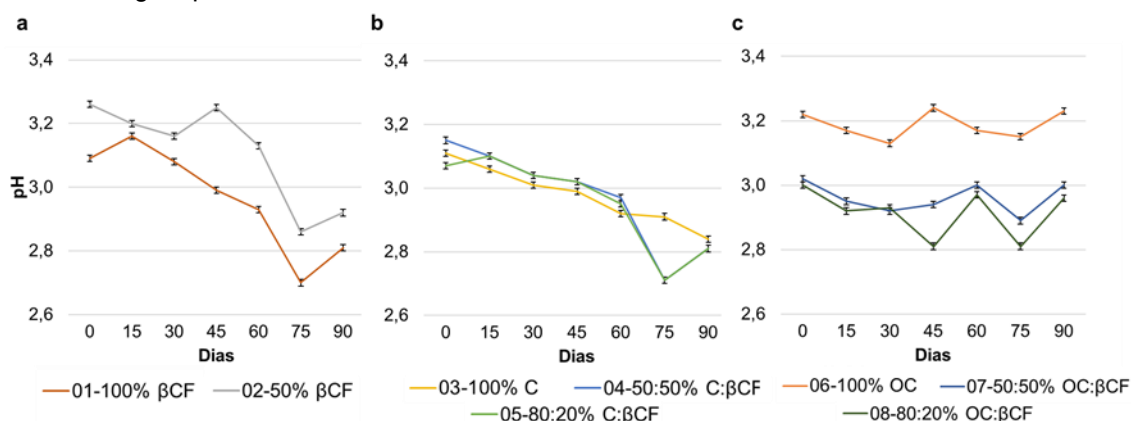
4.4.2 Estabilidade Química

A estabilidade química foi expressa nas Tabela 6 e Tabela 7, em função da variação entre o pH inicial e o pH obtido após os 3 meses de monitoramento. Para uma maior visualização do comportamento, os valores de pH foram representados graficamente na Figura 22 e Figura 23, para as dispersões com APCL e BPCL, respectivamente.

Assim como na avaliação da estabilidade estática, a alteração na massa molar do polímero e o teor de sólidos das dispersões não causou influência na estabilidade química. Para ambos os polímeros, APCL e BPCL, as formulações apenas com βCF (**a**) e as com crodamol (**b**) mostraram uma tendência a diminuição do pH em função do tempo de armazenamento, enquanto as dispersões contendo OC (**c**) decaíram no máximo 0,04 entre os valores finais e iniciais.

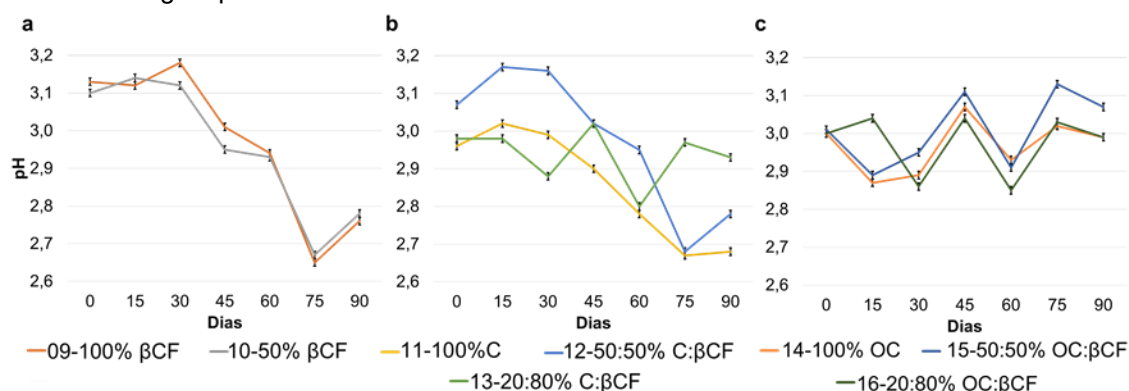
Figura 22 - Gráficos representando o monitoramento do pH, durante 90 dias, das dispersões coloidais de APCL, apenas com βCF, **01-βCF** e **02-βCF** (**a**), ou na presença de crodamol (**b**) **03-C**, **04-C/βCF** e

05-C/βCF ou óleo de copaíba (**c**) **06-OC**, **07-OC/βCF** e **08-OC/βCF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.



Fonte: Autora (2021).

Figura 23 - Gráficos representando o monitoramento do pH, durante 90 dias, das dispersões coloidais de BPCL, apenas com βCF, **09-βCF** e **10-βCF** (a), ou na presença de crodamol (b) **11-C**, **12-C/βCF** e **13-C/βCF** ou óleo de copaíba (c) **14-OC**, **15-OC/βCF** e **16-OC/βCF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.



Fonte: Autora (2021).

O decaimento do pH durante o armazenamento de suspensões nanoparticuladas pode ser indício de degradação do polímero ou outros componentes da formulação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Como esse comportamento também ocorreu nas dispersões **03-C** (22.b, amarelo) e **11-C** (23.b, amarelo), não parece se relacionar à presença ou liberação do βCF nas formulações.

Essa tendência a acidificação já foi relatada na literatura para dispersões com poliésteres, como o PCL. Flores (2011) registrou redução de pH de 6,0 para 4,9, após 2 meses, já as formulações de Pacheco (2014) passaram de 5,2 para 4,2, após 4 meses. De acordo com Schaffazick *et al.* (2003), quando a diminuição se dá em um curto período, pode ser atribuída a ionização dos grupamentos carboxílicos com a relaxação das cadeias poliméricas, que passam a se posicionar na interface. Ou,

poderia ser indício do início da hidrólise do polímero, que estaria sendo favorecida pelo pH ácido do meio.

Lemoine *et al.* (1996) também avaliaram a estabilidade de dispersões de nanopartículas de PCL com diferentes massas molares ($M_w=78$ e $24,9$ kDa), sob diferentes condições de armazenamento. As formulações foram preparadas por nanoprecipitação e utilizando Pluronic F68[®] como surfactante. Os autores relataram que a diferença na massa molar não influenciou na taxa de degradação e que ocorreu um lento processo de degradação quando as dispersões foram armazenadas à 4 °C e a temperatura ambiente, enquanto uma maior degradação ocorreu à 37 °C. Além disso, a dispersão em água levou a acidificação do meio, diminuindo o pH de $4,5$ para $3,5$, após 12 meses, o que teria catalisado o processo de degradação do PCL. Resultado similar foi obtido por Musyanovych *et al.* (2008), com degradação efetivamente mais lenta de dispersões conservadas a 4 °C. Os autores destacam que a degradação de poliésteres alifáticos depende de muitos fatores, como o método de preparação, massa molar do polímero e condições de processamento (temperatura, pH, força iônica), que podem diferir de um estudo para outro, tornando difícil comparar os sistemas de entrega (LEMOINE *et al.*, 1996).

Para as dispersões deste trabalho, a acidificação foi baixa, porém, uma vez que as dispersões com óleo de copaíba não apresentaram esse comportamento, é possível que tenha ocorrido alguma interação do óleo com o polímero, evitando a dissociação dos grupos carboxílicos ou a hidrólise do polímero. Para uma maior clareza sobre a causa da redução do pH, poderiam ter sido mensuradas a massa molar, eficiência de encapsulação e o PZ, ao fim do período de acompanhamento.

4.4.3 Potencial Zeta

A avaliação do potencial zeta (PZ) é uma das medidas mais utilizadas para caracterizar a estabilidade de sistemas coloidais, uma vez que seu valor depende da interação eletrostática entre as partículas. Trata-se de uma propriedade física relacionada ao potencial de superfície das partículas, dependente do tipo e da concentração de íons presentes no sistema. São desejados valores elevados, em módulo, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das nanopartículas e promover boa estabilização.

Os polímeros que constituem as nanopartículas são um dos principais componentes da formulação capazes de interferir na carga de superfície e potencial zeta, e os poliésteres, como PCL, fornecem um potencial negativo à interface (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Além do polímero, a ionização de grupos químicos sobre a superfície ou a adsorção de íons interferem no PZ, portanto, os íons sulfato do surfactante SDS influenciam a magnitude e carga negativa do potencial zeta (LOOSLI; STOLL, 2017). Isso justifica os valores de PZ negativos apresentados por todas as formulações (Tabela 6 e Tabela 7).

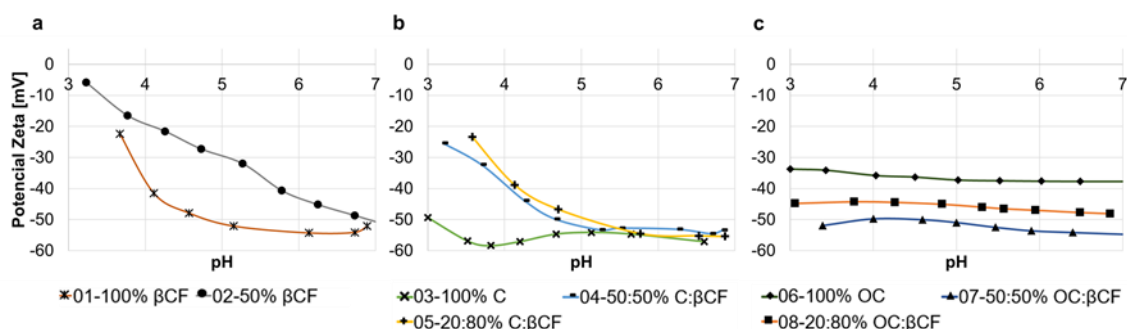
Já a magnitude do PZ variou entre 10 e 50 mV, e, de acordo com Couvreur *et al.* (2002) melhores estabilizações ocorrem com PZ superiores a 30, em módulo. Para ambos os polímeros, os sistemas apenas com β CF resultaram PZ inferior a 30, enquanto os com OC, superiores 30 (Tabela 6 e Tabela 7). Esse resultado está de acordo com o estudo prévio de estabilidade, em que as dispersões sem coestabilizador, **01- β CF**, **02- β CF**, **09- β CF** e **10- β CF**, de maneira geral, apresentaram os menores tempos de estabilidade, inferiores a 60 dias, com exceção da **10- β CF**. Enquanto as dispersões contendo OC, **06-OC**, **07-OC/ β CF**, **08-OC/ β CF**, **14-OC**, **15-OC/ β CF** e **16-OC/ β CF**, mantiveram-se estáveis por pelo menos 75 dias, com exceção da **08-OC/ β CF**.

Estudos com composições similares e utilizando PCL, obtiveram resultados similares. Rosado, Silva e Reis (2013) investigaram o potencial zeta de nanopartículas de PCL, sem surfactante e com SDS, e obtiveram PZ igual a -42 e -58 mV, respectivamente, atribuído ao potencial negativo da PCL e à capacidade do SDS em aumentar a estabilização negativamente. Outros trabalhos utilizando surfactantes não iônicos, como Tween 80 e Pluronic, costumam apresentar um potencial de superfície um pouco inferior, entre -19 e -30 mV, o que pode ser atribuído a tendência desses surfactantes de reduzir o valor absoluto do potencial zeta, conforme Schaffazick *et al.* (2003). (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010; PACHECO, 2014).

O PZ também foi avaliado frente à variação de pH do meio, o que possibilitou definir a melhor faixa de pH para a conservação e aplicação dos sistemas coloidais desenvolvidos (Figura 24 e Figura 25).

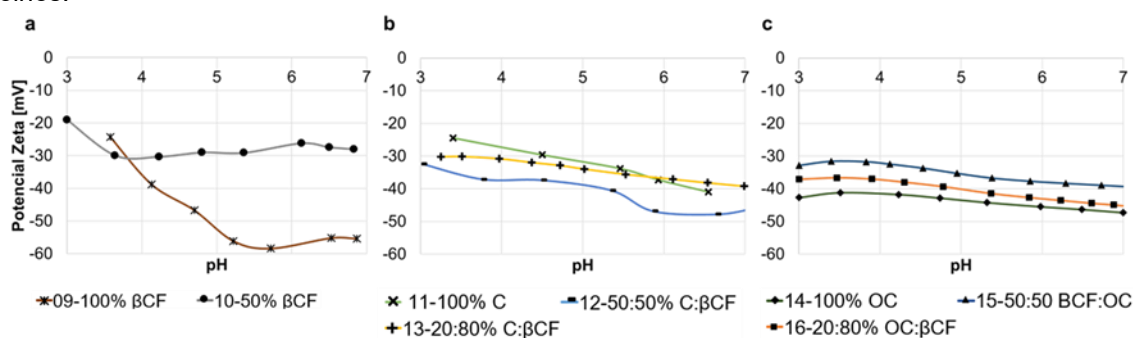
Figura 24 - Gráficos do potencial Zeta em função do pH das dispersões coloidais de APCL apenas com β CF **01- β CF** e **02- β CF** (a), ou na presença de Crodamol (b) **03-C**, **04-C/ β CF** e **05-C/ β CF** ou Óleo de

Copaíba (c) **06-OC**, **07-OC/βCF** e **08-OC/βCF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.



Fonte: Autora (2021).

Figura 25 - Gráficos do potencial Zeta em função do pH das dispersões coloidais de BPCL apenas com βCF **09-βCF** e **10-βCF** (a), ou na presença de Crodamol (b) **11-C**, **12-C/βCF** e **13-C/βCF** ou Óleo de Copaíba (c) **14-OC**, **15-OC/βCF** e **16-OC/βCF**. As linhas entre os pontos são somente uma guia para os olhos.



Fonte: Autora (2021).

Para a maioria das dispersões, o potencial zeta sofreu pouca influência do pH na faixa avaliada, entre 3-7. No entanto, o aumento do pH levou a um aumento do PZ das nanopartículas **01-βCF** (24.a , laranja), **02-βCF** (24.a , cinza), **03-C** (24.b , azul), e **09-βCF** (25.a , laranja), que se mostraram menos estáveis conforme a magnitude do PZ, em pH 3. Esse comportamento pode ser atribuído ao processo de adsorção de SDS na superfície das partículas, aumentando a densidade de empacotamento das moléculas de surfactante na superfície e melhorando a estabilidade (HAMBERGER; LANDFESTER, 2011).

Tendo em vista a incorporação das nanopartículas em formulações para tratamento tópico da acne, o pH do produto final deve ser ajustado entre 4-6, para estar em acordo com o pH da pele (PRAKASH *et al.*, 2017). Desse modo, a estabilidade coloidal dos sistemas seria favorecida, já que todas as nanopartículas apresentaram potencial zeta maior que 30 mV, em módulo, dentro dessa faixa de pH.

Além disso, com o aumento do pH, as dispersões poderiam melhorar o tempo de estabilização estática, discutido anteriormente no item 4.4.1.1.

Ainda, de acordo com a literatura, as características da superfície das nanopartículas podem influenciar sua interação com a pele. Alguns autores destacaram que carga negativa das nanopartículas pode proporcionar um maior tempo de contato com a pele, uma vez que a pele humana possui potencial zeta em torno de + 23 mV. No entanto, também existem resultados com boa permeação de nanopartículas com carga superficial positiva, portanto, como esse assunto ainda é controverso, os ensaios de permeação devem ser avaliados caso a caso (FILON *et al.*, 2015; PROW *et al.*, 2011).

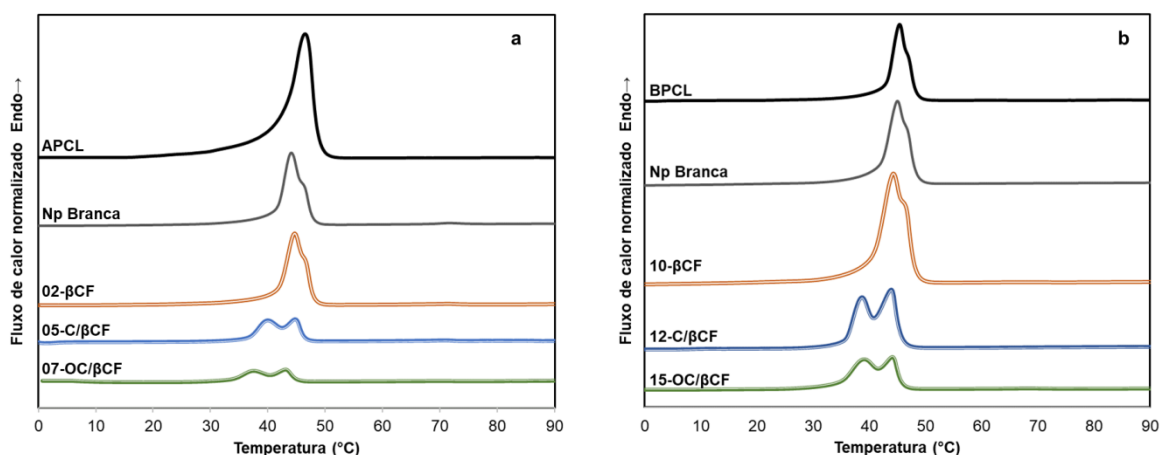
4.5 Propriedades térmicas

A avaliação das propriedades da matriz de nanopartículas é importante para verificar a miscibilidade dos ativos na matriz polimérica e possíveis interações entre ativos e polímero, pois esses aspectos podem influenciar na liberação do fármaco (MELLO; RICCI-JÚNIOR, 2011). Em função disso, para investigar a influência das diferentes massas molares dos polímeros e das composições das nanopartículas, na temperatura e energia envolvidas nas transições de fase, bem como na organização estrutural, foram realizados ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Foram analisados os polímeros puros e algumas nanopartículas dos três tipos de sistemas propostos (apenas β CF, com OC ou crodamol).

As análises foram realizadas em uma faixa de temperatura que incluiu a temperatura de fusão dos componentes presentes nas nanopartículas, PCL, β CF, crodamol e óleo de copaíba. Para todas as amostras, foi possível verificar apenas um evento térmico nas curvas de DSC em faixa de temperatura referente a fusão do PCL. A Figura 26 apresenta as curvas do segundo aquecimento do polímero APCL e das nanopartículas com esse polímero, a esquerda (**a**), e do BPCL e as correspondentes nanopartículas, a direita (**b**). Considerando as curvas das nanopartículas contendo os ativos (laranja, azul e verde), a presença de apenas um evento térmico de fusão, em temperatura próxima da fusão do PCL, indica que não ocorreu separação de fases e que os ativos estão dispersos na matriz polimérica de forma amorfa. (ATHANASOULIA *et al.*, 2017; JEONG; LEE; CHO, 2003; MACHADO, 2015; MELLO;

RICCI-JÚNIOR, 2011). Jeong, Lee e Cho (2003) e Mello e Ricci (2011) confirmaram essa evidência dada por DSC, através de estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), obtendo os mesmos padrões cristalinos tanto para as partículas brancas como para as contendo o fármaco.

Figura 26 - Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) do segundo aquecimento. (a): APCL puro (preto), NP-Branca (cinza), 02- β CF (laranja), 05-C/ β CF (azul), 07-OC/ β CF (verde). (b): BPCL puro, NP-Branca (cinza), 10- β CF (laranja), 12-C/ β CF (azul), 15-OC/ β CF (verde).



Fonte: Autora (2021).

Nos termogramas de aquecimento, a temperatura do pico foi definida como a temperatura de fusão (T_f), e a energia envolvida na fusão, entalpia de fusão (ΔH_f), foi obtida pela integração do pico; o mesmo se estende para a cristalização, definindo a temperatura de cristalização (T_c), e entalpia de cristalização (ΔH_c), nos termogramas do resfriamento. Todos esses dados estão representados na Tabela 8 e Tabela 9, para APCL e BPCL, respectivamente.

Tabela 8 - Resultados de DSC referentes ao segundo ciclo de aquecimento do polímero APCL puro ($M_n=80$ kDa), NP-Branca, 02- β CF, 05-C: β CF e 07-OC/ β CF.

Amostra	$T_{\text{cristalização}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H_{\text{cristalização}}$ ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$)	$T_{\text{fusão}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H_{\text{fusão}}$ ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$)
APCL	12	-59,3	47	62,0
NP-Branca ^b	20	-65,9	44	65,6
02- β CF (50% ^c)	20	-63,2	45	61,9
05-C/ β CF (20:80% ^c)	16	-50,5	40/45 ^a	51,2

07-OC/βCF (50:50% ^c)	13	-31,0	39/43 ^a	30,1
--	----	-------	--------------------	------

^a Temperatura do primeiro pico de fusão (α) / Temperatura do segundo pico (β); ^b formulação apenas com polímero e surfactante na fase orgânica; ^c em relação ao polímero.
Fonte: Autora (2021).

Tabela 9 - Resultados de DSC referentes ao segundo ciclo de aquecimento do polímero BPCL puro (Mn=12,5 kDa), **NP-Branca**, **10-βCF**, **13-C/βCF**, **12-C/βCF**, **11-C** e **15-OC/βCF**.

Amostra	T_{cristalização} (°C)	ΔH_{cristalização} (J.g ⁻¹)	T_{fusão} (°C)	ΔH_{fusão} (J.g ⁻¹)
BPCL	21	-75,5	45	78,5
NP-Branca ^b	21	-75,7	45	77,7
10-βCF (50% ^c)	21	-74,4	44	75,1
13-C/βCF (20:80% ^c)	13	-67,2	37/43 ^a	66,9
12-C/βCF (50:50% ^c)	12	-51,8	39/44 ^a	53,4
11-C (100% ^c)	12	-41,2	38/43 ^a	42,9
15-OC/βCF (50:50% ^c)	13	-57,0	39/44 ^a	56,3

^a Temperatura do primeiro pico de fusão (α) / Temperatura do segundo pico (β); ^b formulação apenas com polímero e surfactante na fase orgânica; ^c em relação ao polímero.
Fonte: Autora (2021).

Analisando os resultados dos polímeros puros, a entalpia obtida para o APCL (62,0 J.g⁻¹) foi inferior à do BPCL (78,5 J.g⁻¹). A partir da relação desse valor com a entalpia de fusão de um cristal perfeito de PCL, ($\Delta H_f^\circ = 139,3 \text{ J.g}^{-1}$), foi definida a cristalinidade de 45%, para APCL, e 56%, para BPCL (KOENIG; HUANG, 1995). Em investigação sobre a relação entre o grau de cristalinidade e massa molar do PCL, Jenkins e Harrison (2006), mostraram que a cristalização do PCL ocorre de acordo com a teoria da reptação-nucleação e a cinética é mais lenta para amostras de alta massa molar em função da mobilidade reduzida das cadeias mais longas, formando alças e cílios que obstruem os processos de reptação, dificultando o espessamento da lamela. Em função disso o grau final de cristalinidade diminui para Mn maiores, como observado nos resultados obtidos neste e em outros trabalhos da literatura (JENKINS; HARRISON, 2006; KOENIG; HUANG, 1995; MELLO; RICCI-JÚNIOR, 2011; TUBA; OLÁH; NAGY, 2014).

No que se refere a temperatura de cristalização, a do APCL (12°C) foi bastante inferior à do BPCL (21°C). Esse comportamento pode ser interpretado em termos do aumento da viscosidade, e conseqüente emaranhado de cadeias, com o aumento da massa molar, necessitando um maior resfriamento para que ocorra a cristalização (JENKINS; HARRISON, 2006). Com relação a temperatura de fusão (T_f), apesar de uma pequena diferença entre a obtida para o APCL e o BPCL, de 47 e 45 °C, observando as curvas em preto na Figura 26 **a** e **b**, foi possível verificar que o APCL apresentou um pico mais largo, com uma porção considerável abaixo de 47° C. Essa variação da temperatura inicial de fusão está relacionada a fusão dos pequenos cristais e à imperfeição dos cristalitos de APCL, quando comparados aos de BPCL, com curva mais estreita e organização mais homogênea dos cristais (JEONG; LEE; CHO, 2003).

Esse comportamento se estende para as nanopartículas, ou seja, as compostas por APCL apresentaram entalpia de fusão consideravelmente menores do que às de BPCL, conforme mostrado na Tabela 8 e Tabela 9. Esses resultados indicam que quanto maior for a massa molar, maior será o aumento da fase amorfa, o que resulta em uma microestrutura cristalina mais grosseira (TUBA; OLÁH; NAGY, 2014). Jeong, Lee e Cho (2003) confirmaram esse comportamento por SAXS, demonstrando que a duração do período longo é maior para micropartículas com PCL de maior massa molar, e atribuíram a esse comportamento a maior liberação obtida por essas partículas, em comparação com as de menor massa molar.

Além disso, a temperatura e entalpia de fusão das nanopartículas contendo os ativos foi inferior às obtidas pelo polímero puro. A diminuição da entalpia de fusão, de maneira geral, indica a presença de estruturas mais desordenadas, com lamelas mais finas na matriz da nanopartícula que do polímero original (SCHLEGEL *et al.*, 2017). Esse comportamento está associado ao crescimento limitado dos domínios cristalinos no espaço curvo das nanopartículas (WANG *et al.*, 2018). Já a temperatura de fusão depende do tamanho e perfeição da estrutura cristalina de PCL, que é afetada pela presença dos ativos no volume da matriz polimérica (ATHANASOULIA *et al.*, 2017). Uma estrutura cristalina mais grosseira de PCL foi amplamente relatada, especialmente, quando agentes de nucleação adicionais estão presentes na forma amorfa (LV *et al.*, 2016). Portanto, a presença, principalmente dos coestabilizadores

na matriz polimérica, de forma amorfa, levou a uma maior diminuição da T_f , para as nanopartículas **05-C/ β CF**, **07-OC/ β CF**, **11-C**, **12-C/ β CF**, **13-C/ β CF** e **15-OC/ β CF**.

Além disso, foi identificada uma diminuição de cerca de 7°C da temperatura de cristalização (T_c) das nanopartículas contendo os coestabilizadores, em comparação com as Np-brancas e as contendo 50% β CF:polímero, **02- β CF** e **10- β CF**. A diminuição da T_c indica a ocorrência de duas fases cristalinas diferentes ou os efeitos do nanoconfinamento. Desse modo, o pequeno volume das nanopartículas contendo os ativos resulta em maior subresfriamento (SCHLEGEL *et al.*, 2017). Assim, o maior volume de ativos dispersos nas nanopartículas com os coestabilizadores e composição de 100% $_m$ de ativos em relação ao polímero, causaram maior influência na T_c do PCL, comparadas as com 50% $_m$.

Já a forma do pico de fusão, além de consequência da diminuição da T_c , indica uma modificação na organização cristalina, que pode ser resultado de uma transição cristalina polimórfica. A partir dos termogramas de DSC, foi possível verificar que a presença de crodamol (azul) e óleo de copaíba (verde) nas nanopartículas **05-C/ β CF** e **07-OC/ β CF** (Figura 26.a), e **12-C/ β CF** e **15-OC/ β CF** (Figura 26.b), causou um perfil do pico de fusão diferente dos demais sistemas, com um comportamento de dupla fusão. Surgiu um pico deslocado a temperaturas mais baixas, fase α , devido à fusão e recristalização parcial de um cristalito imperfeito, enquanto o pico de temperatura mais alta, fase β , corresponde à fusão do cristalito mais bem organizado (ATHANASOULIA *et al.*, 2017). Esse comportamento também foi evidenciado por Zanetti (2018), que desenvolveu sistemas nanoestruturados contendo o ativo geranyl cinamato em PCL ($M_n = 2$ kDa), visando a aplicação em tecidos para ação bactericida.

De acordo com a literatura, a liberação de ativos incorporados a nanopartículas de PCL se dá principalmente por difusão, em função da sua degradação lenta em meio aquoso, como consequência de sua semicristalinidade e hidrofobicidade (JEONG; LEE; CHO, 2003). O grau de cristalinidade é o fator dominante que possibilita o acesso da água às ligações éster, entre outros, como a massa molar, a temperatura de transição vítrea e as dimensões da amostra global. Assim, foi sugerido que as regiões amorfas podem se degradar preferencialmente, deixando as lamelas cristalinas intactas (JENKINS; HARRISON, 2006). Esse comportamento relacionado à degradação do PCL se estende a liberação dos ativos,

uma vez que domínios cristalinos são conhecidos por limitar e impedir a difusão da molécula que está permeando (SCHLEGEL *et al.*, 2017).

Portanto, é esperado que as menores entalpias e domínios cristalinos das nanopartículas contendo OC ou crodamol possibilitem uma maior difusão dos ativos através da matriz polimérica. E, dentre os diferentes tipos de polímero, espera-se que a taxa de liberação dos sistemas de APCL seja maior, em função das menores entalpias, decorrente das lamelas menos espessas e cristais menos organizados. Esse comportamento foi confirmado no estudo prévio de liberação e na atividade anti-inflamatória, e serão discutidos posteriormente.

4.6 Atividade Antimicrobiana

O ensaio para verificação da atividade antimicrobiana dos ativos livres e encapsulados frente a bactéria *Propionibacterium acnes*, foi conduzido pelo método de microdiluição em caldo. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da bactéria nos poços de microdiluição. Os poços com concentrações acima da CIM, ou seja, que visualmente não apresentaram crescimento microbiano, foram plaqueados em ágar e a concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como concentração em que não houve crescimento bacteriano.

Os ensaios com os ativos β CF e OC, em sua forma livre, não foram reprodutíveis em 4 ensaios distintos, não havendo reprodutibilidade entre os resultados de um ensaio para o outro. Já as dispersões de nanopartículas avaliadas apresentaram ação bactericida frente a *P. acnes*. As duas dispersões avaliadas primeiramente foram do polímero de menor massa molar, devido à maior concentração de ativos incorporados nas dispersões com esse polímero. A formulação **12-C/ β CF**, com crodamol, apresentou CIM de $0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$ e CBM de $0,63 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto a **15-OC/ β CF**, com OC, teve uma melhor ação com a mesma CIM e CBM, de $0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tabela 10).

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das nanopartículas **12-C/ β CF** e **15-OC/ β CF**, de BPCL, frente a bactéria *Propionibacterium acnes*.

CIM	CBM
(mg.mL^{-1})	(mg.mL^{-1})

12 - C/βCF (50:50%)	0,31	0,63
15 - OC/βCF (50:50%)	0,31	0,31

Fonte: Autora (2021).

A menor CBM obtida para a **15-OC/ β CF** pode estar relacionada a uma atuação sinérgica do β CF com o OC, aumentando a suscetibilidade da bactéria. No ensaio de DSC, as duas nanopartículas apresentaram o perfil de dupla fusão nas mesmas temperaturas, no entanto, a entalpia associada a nanopartícula **15-OC/ β CF** foi de 56,3 J.g⁻¹, um pouco superior a **12-C/ β CF**, de 53,4 J.g⁻¹. Para verificar a hipótese do efeito sinérgico do óleo de copaíba na ação bactericida, poderia ser realizado um ensaio de liberação dessas duas partículas, caso a liberação da **12-C/ β CF** realmente for mais rápida devido a menor entalpia, a hipótese seria confirmada.

A atividade antimicrobiana do β CF frente a bactéria *P. acnes* foi identificada previamente por Sato *et al.* (1993) e Kubo *et al.* (1994). Na patente desenvolvida por Sato *et al.* (1993), foi definida uma CIM de 3,13 μ g.mL⁻¹ e no trabalho de Kubo *et al.* (1994), de 6,25 μ g.mL⁻¹. Kubo e colegas também identificaram a ação dos sesquiterpenos δ -Cadinene e α -humuleno, que também compõem o óleo de copaíba, com uma CIM ainda menor, de 3,13 μ g.mL⁻¹. Os autores utilizaram o método de diluição seriada em tubo, diferentemente do adotado neste trabalho. Não foi encontrado mais nenhum estudo da atividade do β CF ou OC, livres ou encapsulados, especificamente para a *P. acnes*, no entanto, existem investigações dos ativos livres frente a outras bactérias.

Em estudo para avaliação da atividade antimicrobiana de 4 óleos essenciais e seus compostos majoritários, Schmidt *et al.* (2006) definiram a CIM de 312 μ g.mL⁻¹ de β CF, para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e gram-negativa *Escherichia coli*. Uma expressiva ação antimicrobiana do β CF foi verificada, com CIM inferior à dos 4 óleos essenciais e de 9 compostos também presentes nos óleos, tanto oxigenados como hidrocarbonetos. Os autores utilizaram a microdiluição para a caracterização, o mesmo método do presente trabalho, porém, a solução de agente antimicrobiano no primeiro poço do ensaio continha 50% de DMSO, o que implica numa maior solubilização dos ativos.

Goren *et al.* (2011), pelo método de disco-difusão em ágar, atribuiu a atividade antimicrobiana de 22 óleos essenciais avaliados aos sesquiterpenos hidrocarbonetos presentes em concentração majoritária, uma vez que o β CF e o α -Pino apresentaram melhores resultados que os oxigenados, óxido de linalol e óxido de cariofileno. Assim, como no ensaio de Schmidt *et al.* (2006), a suscetibilidade de todas as cepas avaliadas foi maior para o β CF, com os maiores halos de inibição dentre todos os óleos e componentes.

Ainda, o β CF apresentou forte atividade contra todas as cepas bacterianas testadas por Dahham *et al.* (2015), tanto por disco difusão como por diluição em série, com valores de CIM entre 3 e 14 μ M (0,61 – 4,10 μ g.mL⁻¹). Sendo as bactérias gram-positivas mais suscetíveis que as gram-negativas, com a menor CIM, para a gram-positiva *S. aureus*. De maneira geral, as bactérias gram-positivas, como a *P. acnes*, são mais suscetíveis a óleos essenciais (OEs) e seus componentes, por possuírem membrana externa menos complexa e rígida, facilitando a difusão de compostos hidrofóbicos através dela, quando comparadas às gram-negativas (RAI *et al.*, 2017).

Embora existam numerosos estudos relatando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, poucos estudos enfocam a atividade de um único composto (SHARMA *et al.*, 2016). Em função disso, existem mais trabalhos que evidenciam a atividade antimicrobiana de óleos contendo β CF, do que sobre sua ação em si, como ocorre com óleo de copaíba (*Copaifera*). Sem considerar a espécie avaliada, a maioria dos ensaios com OC para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados por microdiluição em caldo e identificaram melhor ação frente a bactérias gram-positivas, com CIM para *S. aureus* entre 100 e 1000 μ g.mL⁻¹ (FARIA, 2014; MARANGON, 2015; MASSON *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2018; PIERI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008). Considerando o mesmo óleo utilizado no presente trabalho, obtido pela espécie *Copaifera multijuga* Hayne, dois trabalhos identificaram suscetibilidade da bactéria gram positiva *S. aureus*. Santos *et al.* (2008) obtiveram as concentrações de 500 e 1000 μ g.mL⁻¹, como CIM e CBM, respectivamente, e não identificaram suscetibilidade às bactérias gram negativas. Para esse ensaio, também foi utilizado DMSO para solubilizar o OC, porém não foi identificada a concentração. Já no trabalho de Mendonça e Onofre (2009), seguindo a metodologia de disco-difusão, tanto bactérias gram-negativas como gram-positivas foram suscetíveis ao óleo de copaíba.

Apesar da ampla diversidade de espécies do gênero *Copaifera* configurar um fator limitante para comparação entre os estudos, as divergências entre os resultados parecem estar relacionadas ao método e ao dispersante utilizados, assim como para o β CF. Os métodos para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antibacterianos foram desenvolvidos e padronizados para substâncias solúveis em água, e requerem adaptação para óleos e compostos insolúveis (MARANGON, 2015). A menor solubilidade e capacidade de formar ligações de hidrogênio dos hidrocarbonetos diminui sua solubilidade e difusão em meio aquoso, dificultando sua caracterização como agentes antimicrobianos (GRUJIC-JOVANOVIC *et al.*, 2004).

Segundo Veldhuizen *et al.* (2006), alguns pesquisadores têm utilizado outros métodos ou adaptações para superar os problemas de imiscibilidade de óleos ou seus compostos em soluções aquosas, como o uso do composto puro em ensaios de difusão em disco, o uso de emulsões do composto por agitação vigorosa, ou a adição de um emulsificante ou ágar à solução. A adição de um emulsificante à mistura óleo/água e a quantidade de solvente utilizada para solubilizar pode resultar em uma distribuição mais uniforme do composto sobre a solução aquosa. Isso influencia a atividade de um composto porque a área de contato entre os compostos e as bactérias é aumentada, o que pode ter ocorrido no experimento de Schmidt *et al.* (2006) e Santos *et al.* (2008), utilizando maior concentração de DMSO. No entanto, apesar das melhoras na reprodutibilidade dos resultados, esses métodos não são específicos para quantificar a atividade antimicrobiana dos compostos em si e diferentes resultados de atividade para o óleo de copaíba (MARANGON, 2015). Além disso, uma emulsão está em um nível molecular não comparável a uma verdadeira solução de um composto (VELDHUIZEN *et al.*, 2006)

Ainda, de acordo com a literatura, a presença de grupos funcionais na composição dos OEs, contribui para a atividade antimicrobiana (DORMAN; DEANS, 2000). Por essa razão, os compostos oxigenados presentes nos óleos essenciais, em especial os fenólicos como carvacrol, eugenol e timol, possuem maior destaque relacionado ao potencial efeito antimicrobiano, atribuído à hidroxila fenólica presente em suas estruturas (LERTSATITTHANAKORN *et al.*, 2006). No entanto, mesmo sendo um hidrocarboneto e com baixa solubilidade, o β CF demonstrou efeito antimicrobiano e recebeu destaques nas pesquisas de Schmidt *et al.* (2006), Goren *et*

al. (2011), Kubo *et al.* (1994) e Sato *et al.* (1993). Além disso, foi identificado um comportamento inverso ao descrito por Lertsatitthanakorn *et al.* (2006), com melhor ação dos hidrocarbonetos, como o β CF, em comparação aos oxigenados avaliados nos mesmos estudos (GOREN *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2006). Esses resultados evidenciam a atividade antimicrobiana do β CF e motivam sua aplicação e estudos explorando esse potencial.

Neste trabalho, a incorporação do β CF e do óleo de copaíba em nanopartículas, contornou a problemática da hidrofobicidade, possibilitando a identificação da atividade antimicrobiana. Em contrapartida, a alta hidrofobicidade dos ativos, possivelmente, tenha sido o fator limitante para a identificação da atividade pelo método de microdiluição. Por hipótese, embora Tween 80® e DMSO tenham sido utilizados para melhorar a dispersão, uma emulsão instável foi formada, causando variações na difusão dos ativos, no contato com a bactéria e nos resultados obtidos entre um experimento e outro.

De acordo com Gomes, Moreira e Castell-Perez (2011), a utilização de nanopartículas para encapsular compostos antimicrobianos hidrofóbicos poderia melhorar sua eficácia devido a 3 fatores principais: hidrofiliabilidade melhorada, liberação sustentada e o tamanho diminuto. Motivados por isso, os autores desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo dois compostos presentes naturalmente em óleos essenciais e com ação antimicrobiana comprovada. O sistema e a metodologia foram bastante similares ao deste trabalho, sendo utilizado o método de miniemulsificação-evaporação do solvente, para obtenção de nanopartículas com diâmetro médio em torno de 200 nm, e eficiência de encapsulação de 98 e 92% para o eugenol e trans-cinamaldeído, respectivamente. A eficácia antimicrobiana dos dois sistemas foi avaliada por microdiluição, e as CIMs foram de 800 e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para ambas as partículas, frente a bactéria gram-negativa, *Salmonella spp.*, e gram-positiva, *Listeria spp.*, respectivamente. Ainda, os autores avaliaram a liberação durante 72 h, e 64% e 87% da carga inicial foi liberada para eugenol e trans-cinamaldeído, respectivamente, indicando ação prolongada dos agentes antimicrobianos.

Além da possibilidade de promover a liberação prolongada, considerando a aplicação tópica, sabe-se que nanopartículas poliméricas podem se acumular nas estruturas foliculares por até 10 dias (LADEMANN *et al.*, 2006). Desse modo, a

concentração local do fármaco aumenta, o que melhoraria a ação dos agentes antimicrobianos, uma vez que nos ensaios *in vitro* o contato das nanopartículas com o meio inoculado foi de 48 e 96 h, para definir a CIM e CBM, respectivamente.

Contudo, apesar de ser a principal razão pela dificuldade em quantificar e padronizar a avaliação da atividade antimicrobiana, a hidrofobicidade dos óleos essenciais e a natureza lipofílica dos seus componentes permitem a interação com os ácidos graxos da membrana celular bacteriana (RAI *et al.*, 2017). Em função disso, o desenvolvimento de nanopartículas contendo β CF e OC, apresenta-se como uma estratégia promissora, facilitando sua entrega, melhorando a atividade antimicrobiana, aumentando a solubilidade e estabilidade dos ativos.

4.7 Atividade Anti-inflamatória

Conforme abordado na revisão da literatura, a inflamação é sugerida como um fator chave envolvido no desenvolvimento e agravamento da acne. Ainda que não sejam totalmente esclarecidos os mecanismos inflamatórios na patogênese da acne, de acordo com a literatura, o excesso de produção de sebo é atribuível a distúrbios inflamatórios desencadeados por duas vias principais, a proliferação excessiva da *P. acnes* e o acúmulo de peróxidos lipídicos (JIN; LEE, 2018; TANGHETTI, 2013). Estudos anteriores descobriram que a *P. acnes* produz diversas enzimas envolvidas no processo de ruptura folicular e inflamação dérmica. Além das enzimas, produz fatores quimiotáticos para neutrófilos e monócitos, resultando na atração de células do sistema imunológico, e, por meio de fragmentos de sua parede celular, estimula macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e IL-8, e TNF- α (HASSUN, 2000; HUANG *et al.*, 2014; SHALITA, 2001; VEZZANI; FRIEDMAN; DINGLELINE, 2013). Além desses mediadores inflamatórios, a citocina IL-10 também teve sua expressão aumentada em pacientes com acne, sendo 46 vezes maior em lesões de acne do que na pele sem lesão (TANGHETTI, 2013).

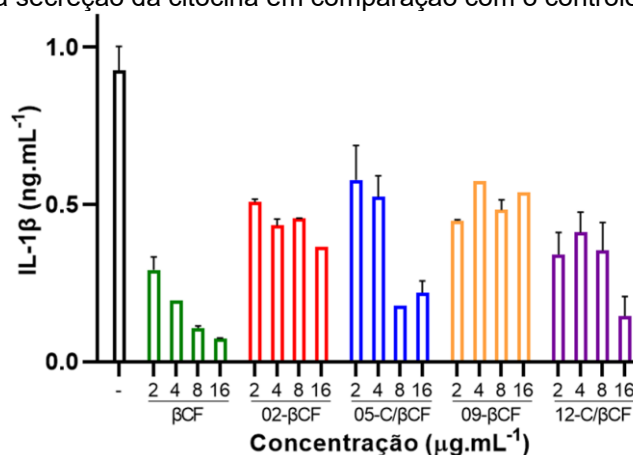
Em vista disso, foi utilizado um modelo inflamatório geral com células RAW267 estimuladas por lipossacarídeos (LPS), para avaliar o efeito inibitório do β CF e 4 dispersões, **02- β CF**, **05-C/ β CF**, **10- β CF** e **12-C/ β CF**, na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, representados na Figura 27, Figura 28 e Figura 29, respectivamente. Foram avaliadas as concentrações de 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de β CF. Os tratamentos

foram comparados com o controle, sistema composto pelas células mais o LPS, na ausência de tratamento, em preto nos gráficos.

De maneira geral, o β CF demonstrou um grande potencial em inibir a secreção das 3 citocinas avaliadas e sua ação ocorreu de maneira dose-dependente, de acordo com os trabalhos de Fernandes *et al.* (2007), Gertsch, (2008), Guo *et al.* (2014) e Hu *et al.* (2017), Al-taee *et al.* (2019), Koyama *et al.* (2019) e Peterle *et al.* (2020). Além disso, diferentemente da ação antimicrobiana, é reconhecido que os sesquiterpenos hidrocarbonetos possuem maior atividade anti-inflamatória que os sesquiterpenos oxigenados (MACIEL *et al.*, 2002).

As dispersões também reduziram significativamente a expressão dos mediadores inflamatórios para todas as concentrações testados, mas não apresentaram uma influência clara relacionada a dose. Quando incorporado nas nanopartículas, o β CF precisa transpor uma maior barreira difusional para ser liberado através da matriz polimérica, justificando os melhores resultados obtidos pelo ativo na forma livre a partir deste ensaio.

Figura 27 - Efeito do β CF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), **02- β CF** (■) e **05-C/ β CF** (■), e de menor massa molar (BPCL), **10- β CF** (■) e **12-C/ β CF** (■), na expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle negativo (■), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Todos os tratamentos inibiram significativa ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.

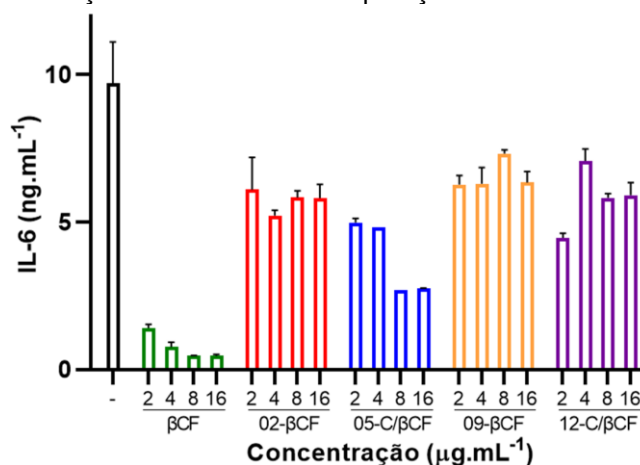


Fonte: Autora (2021).

Na concentração de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as dispersões de APCL e BPCL, contendo crodamol, **05-C/ β CF** (azul) e **12-C/ β CF** (roxo), apresentaram inibição similar ao β CF (verde) na concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, equivalente a uma redução da expressão da citocina de aproximadamente 80% em relação ao controle (preto). Já as dispersões

apenas com o ativo, **02-βCF** (vermelho) e **10-βCF** (laranja), mantiveram uma secreção em torno de $0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$, aproximadamente 50% de inibição.

Figura 28 - Efeito do βCF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), **02-βCF** (■) e **05-C/βCF** (■), e de menor massa molar (BPCL), **10-βCF** (■) e **12-C/βCF** (■), na expressão da citocina pró-inflamatória IL-6. Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle positivo (■), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Todos os tratamentos inibiram significativamente ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.

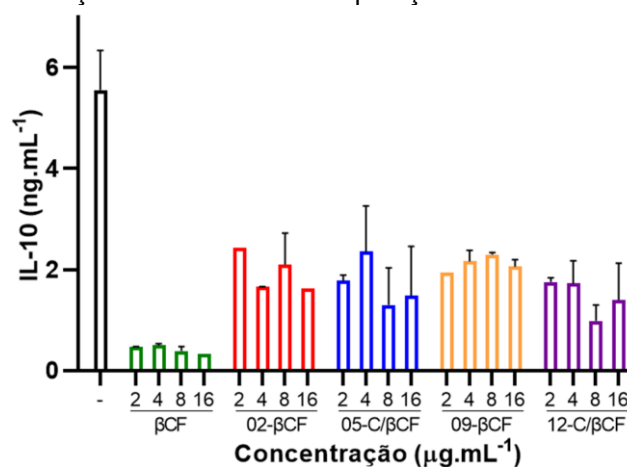


Fonte: Autora (2021).

Para a citocina IL-6, o βCF suprimiu aproximadamente 95% da secreção nas concentrações de 8 e $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As dispersões apresentaram comportamento similar entre si e não dose-dependente, com exceção da **05-C/βCF** (azul), com uma maior inibição nas concentrações de 8 e $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com secreção em torno de $2,7 \text{ ng.mL}^{-1}$, equivalente a 70% de inibição.

Figura 29 - Efeito do βCF (■) e das dispersões com o polímero de maior massa molar (APCL), **02-βCF** (■) e **05-C/βCF** (■), e de menor massa molar (BPCL), **10-βCF** (■) e **12-C/βCF** (■), na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Monócitos murinos (RAW267) foram cultivados na presença de LPS, controle positivo (■), e com as soluções de agentes a serem testados nas concentrações de 2, 4, 8 e

16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio. Todos os tratamentos inibiram significativa ($p < 0,05$) a secreção da citocina em comparação com o controle.



Fonte: Autora (2021).

Por fim, o βCF inibiu aproximadamente 92% da expressão da citocina inflamatória IL-10, enquanto as diferentes dispersões inibiram entre 60 e 70%. Foi verificada atividade um pouco mais expressiva da dispersão **12-C/ βCF** (roxo), na concentração de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, equivalente a 80% de inibição

Observando os resultados da inibição da IL-1 β (Figura 27) e IL-6 (Figura 28), em que as diferentes formulações e concentrações apresentaram maior influência na atividade, é possível fazer algumas correlações. Comparando as nanopartículas de um mesmo polímero, nas maiores concentrações, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, uma maior redução foi expressa para as que continham o coestabilizador na formulação, **05-C/ βCF** (azul, APCL) e **12-C/ βCF** (roxo, BPCL), do que as apenas com o ativo **02- βCF** (vermelho, APCL) e **10- βCF** (laranja, BPCL). A presença do coestabilizador parece ter facilitado a difusão do ativo e melhorado o resultado. Esse comportamento pode estar relacionado a forma que o ativo está associado à matriz, e, conseqüentemente, sua liberação. Esse resultado está de acordo com os obtidos por DSC, no item 4.5, em que as nanopartículas contendo os coestabilizadores apresentaram menores entalpias de fusão do que as apenas com o βCF . Ademais, comparando o efeito dessas dispersões, também nas concentrações 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi possível identificar uma maior inibição das citocinas para a **05-C/ βCF** (azul, APCL), do que para a **12-OC/ βCF** (roxo, BPCL).

Uma maior ação anti-inflamatória das nanopartículas de APCL, corrobora com o estudo prévio de liberação, realizado para as dispersões **05-C/ βCF** e **12-C/ βCF** , que indicou uma liberação de 43,3% das nanopartículas de APCL, enquanto as de BPCL

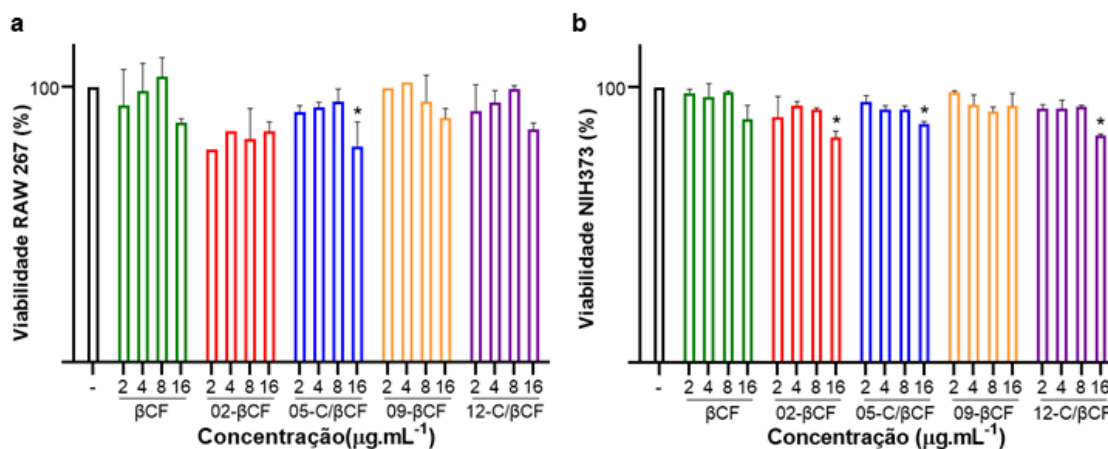
liberaram $24,5 \pm 1,9\%$ da massa inicial relativa ao β CF, durante 24 h. O gráfico com o perfil de liberação está no Apêndice C. Desse modo, os bons resultados da **05-C/ β CF**, podem estar relacionados a sua maior taxa de liberação, considerando o tempo de incubação dos tratamentos com as células no ensaio, que também foi de 24 h. E, da mesma forma como discutido para ação antimicrobiana, quando utilizadas *in vivo* para aplicação tópica, esses resultados podem ser melhorados em decorrência do aumento da concentração dos ativos no folículo pilosebáceo, devido ao acúmulo das nanopartículas por até 10 dias, promovendo uma liberação prolongada e direcionada no local de acometimento da doença (LADEMANN *et al.*, 2006).

4.8 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade das dispersões **02- β CF**, **05-C/ β CF**, **10- β CF** e **12-C/ β CF**, foi realizado com duas linhagens celulares, monócitos (RAW267) e fibroblastos embrionários (NIH3T3), e os resultados estão representados na Figura 30.a e Figura 30.b, respectivamente. A viabilidade celular foi superior a 80% para todas as concentrações avaliadas, não apresentando efeito citotóxico, de acordo com a ISO 10993-5. Segundo a norma, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é um teste inicial, que permite avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso como biomaterial e o efeito citotóxico é considerado quando o material provoca a redução da viabilidade celular em mais de 30% (ISO, 2009).

Figura 30 - Efeito do β CF (□) e das nanopartículas com o polímero de maior massa molar (APCL), **02- β CF** (■) e **05-C/ β CF** (□), e de menor massa molar (BPCL), **10- β CF** (■) e **12-C/ β CF** (□), na viabilidade celular de monócitos murinos (RAW267) (a) e macrófagos murinos (NIHT3T) (b) quando cultivados com diferentes concentrações dos ativos (2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos como porcentagem média de sobrevivência $\pm \sigma$, em relação ao crescimento das células na ausência dos

ativos, controle negativo (□). * Variação significativa da viabilidade quando comparados ao controle com $p < 0,05$.



Fonte: Autora (2021).

Em comparação com o controle, o ensaio de MTT indicou redução significativa da viabilidade para poucas dispersões e apenas nas concentrações mais altas do ativo, $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nos macrófagos (a), a dispersão **05-C/ βCF** (azul) reduziu a viabilidade para 80%, e nos fibroblastos (b), as dispersões **02- βCF** (vermelho), **05-C/ βCF** (azul) e **12-C/ βCF** (roxo), apresentaram redução máxima da viabilidade para $82 \pm 2\%$, referente à **02- βCF** (vermelho).

A biocompatibilidade do PCL é amplamente reportada na literatura, e é uma das principais motivações destacadas para a escolha desse polímero no desenvolvimento de nanocarreadores (BARRIOS, 2010; BRUSCHI, 2010; BYUN *et al.*, 2011; CAZO *et al.*, 2012; OURIQUE *et al.*, 2008; ROSADO; SILVA; REIS, 2013; WEISS-ANGELI *et al.*, 2008). Musyanovych *et al.* (2008), reportaram que nanopartículas de PCL não foram citotóxicas em ensaio *in vitro* com linhagens celulares humanas, HeLa e Jurkat, durante 24 h. Além disso, a cinética de absorção celular das nanopartículas não apresentou influência da massa molar, inferindo que o comprimento da cadeia individual não é o principal fator que afeta a absorção. Também não foi detectada nenhuma correlação consistente entre tamanho ou potencial Zeta de partícula na internalização. Já o surfactante utilizado, influenciou a absorção celular de maneira consistente e nanopartículas utilizando SDS foram absorvidas em maior extensão do que as com o surfactante não iônico Lutensol AT50. Os autores sugerem que esse comportamento pode estar relacionado com a adsorção de alguma proteína na superfície da partícula, uma vez que a membrana celular também é carregada negativamente, causando o aumento da absorção celular.

O perfil de segurança do β CF foi demonstrado por vários estudos *in vitro* e *in vivo*, revelando baixa toxicidade e genotoxicidade para humanos (DAHAM *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2016). Além disso, foi sugerida a segurança de sua utilização durante a gestação, não apresentando toxicidade materna, fetotoxicidade ou embriotoxicidade nas doses aplicadas, que correspondiam a dez vezes a dose recomendada para uso humano (LIMA *et al.*, 2017).

Em experimentos sobre a toxicidade aguda, a dose letal mediana (LD50) de β CF foi superior a 5 g.kg^{-1} para aplicação dérmica, em coelhos, e para ingestão oral, em ratos. Além disso, não causou irritação ou sensibilização em pele humana, em concentrações de até 4% de β CF (OPDYKE, 1973). Devido à sua baixa toxicidade, recebeu o status de “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) pela Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA), em 1997.

O estudo de Sköld *et al.* (2006), revelou que a atividade alergênica do β CF é afetada pela auto-oxidação. O óxido de cariofileno, principal produto de sua oxidação, mostrou ser um alérgeno de força moderada, e, o β CF ao ser exposto ao ar por 10 semanas mostrou uma fraca capacidade de sensibilização no ensaio de linfonodo local, utilizado com o objetivo de identificar substâncias capazes de induzir dermatite de contato. A auto-oxidação do β CF apresentou menor grau de sensibilização quando comparado a outros terpenos como R-limoneno e linalol, que contém hidroperóxidos como compostos majoritários de suas misturas de auto-oxidação e são fortes alérgenos e sensibilizadores. No trabalho de Peterle *et al.* (2020), o desenvolvimento de nanoemulsões contendo β CF para aplicação tópica na cicatrização de feridas, minimizou a irritação cutânea causada pela aplicação do ativo puro na pele, além de aumentar a permeação cutânea e a ação anti-inflamatória, a partir da melhora na solubilidade e biodisponibilidade do β CF.

De maneira geral, a partir dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade *in vitro* para as duas linhagens celulares, as características dos nanossistemas parecem promissoras para aplicações biomédicas e o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando investigações com linhagens celulares humanas e ensaios *in vivo*. Além disso, a incorporação do β CF em nanopartículas poliméricas pode evitar sua oxidação e os efeitos adversos dos produtos de sua auto-oxidação ou do seu contato direto com a pele.

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 RESUMO DOS RESULTADOS

Neste trabalho, dispersões de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo β -cariofileno (β CF) foram desenvolvidas com sucesso, representando a conclusão da primeira etapa de desenvolvimento e otimização de um protótipo terapêutico que potencialmente poderia ser aplicado para o tratamento tópico da acne.

Foram preparadas nanopartículas de PCL de duas massas molares, 80 kDa (APCL) e 12,5kDa (BPCL), utilizando a técnica de miniemulsificação-evaporação do solvente. As principais diferenças entre as formulações com APCL e BPCL foram o teor de sólidos e de ativo incorporado. Nas formulações com APCL foram utilizados 3%_m de polímero em relação ao solvente, obtendo teor de sólidos de 2,1 e 2,7%_m e concentração teórica de β CF entre 4,1 e 1,3 mg.g⁻¹. Enquanto a maior solubilidade do BPCL possibilitou a utilização de 15%_m de polímero em relação ao solvente nas formulações, obtendo dispersões com teor de sólidos de 8,5 e 11,5%_m e concentrações entre 18,5 e 51,5 mg.g⁻¹ de β CF.

O método de miniemulsificação-evaporação do solvente se mostrou eficiente no preparo de nanopartículas de APCL e BPCL, em formulações incorporando apenas β CF ou contendo os coestabilizadores, óleo de copaíba ou crodamol, rendendo elevadas eficiências de encapsulação e distribuições estreitas do tamanho de partícula.

As formulações com APCL e BPCL apresentaram resultados similares de distribuição do tamanho de partículas, pH, eficiência de encapsulação do β CF, potencial de superfície e morfologia. Foram obtidas nanopartículas com diâmetro médio em intensidade (d_p) entre 178 e 220 nm; índice de polidispersão (PDI) inferior a 0,29; pH em torno de 3; eficiência de encapsulação do β CF superior a 96%; potencial zeta absoluto negativo e morfologia esférica.

No ensaio da avaliação do potencial Zeta (PZ) em função do pH do meio, o aumento do pH conservou ou aumentou, em módulo, o potencial zeta das nanopartículas, favorecendo a estabilidade dos nanossistemas. Todas as nanopartículas apresentaram potencial zeta maior que 30 mV, em módulo, na faixa de pH (4-6) recomendada para produtos destinados para aplicação tópica.

A presença de coestabilizador demonstrou ser um fator fundamental para obtenção de distribuições mais homogêneas (menores PDIs) e na estabilidade coloidal dos sistemas, possibilitando dispersões estáveis por 90 dias, a partir do monitoramento de d_p , PDI e pH, e com menores índices de separação (IS), pela avaliação da estabilidade acelerada.

Na avaliação das propriedades térmicas, a presença de apenas um evento térmico nos termogramas de DSC indicaram que os compostos estão dispersos na matriz polimérica de forma amorfa. As nanopartículas com APCL obtiveram menores entalpias de fusão que as com BPCL, devido ao menor grau de cristalinidade do polímero de maior massa molar. As dispersões contendo OC e crodamol, apresentaram as menores entalpias de fusão, devido à modificação na estrutura cristalina do polímero, com o surgimento de cristalitos menos organizados e um comportamento de dupla fusão.

Expressiva ação anti-inflamatória foi obtida pelo β CF e pelas dispersões de nanopartículas de ambos os polímeros, reduzindo significativamente a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. A presença de coestabilizador nas formulações favoreceu a atividade anti-inflamatória e as nanopartículas com APCL apresentaram efeitos um pouco mais expressivos que as com BPCL. Esse resultado corrobora com o estudo prévio de liberação, em que as nanopartículas com APCL, liberaram o β CF mais rapidamente que as com BPCL, e também com os resultados obtidos por DSC, em que as nanopartículas com coestabilizador e de APCL obtiveram menores entalpias de fusão, inferindo menor cristalinidade, o que proporciona uma maior facilidade na difusão e liberação do ativo.

Na avaliação da atividade antimicrobiana frente à bactéria *P. ances*, a incorporação do β CF às nanopartículas melhorou sua solubilidade e as dispersões de BPCL, contendo β CF:OC e β CF:C, possibilitaram o controle do crescimento do microrganismo, com concentração bactericida mínima de 0,31 e 0,63 mg.mL⁻¹. O melhor efeito bactericida da dispersão contendo OC sugere um possível efeito sinérgico do β CF com outros componentes do óleo.

A avaliação *in vitro* da citotoxicidade indicou biocompatibilidade das dispersões e seu potencial para aplicações biomédicas, uma vez que não causaram efeito citotóxico em todas as concentrações testadas.

5.2 CONCLUSÃO

Levando em consideração os fatores fisiopatológicos da acne, uma nanocarreador biocompatível, com atividade antimicrobiana para *P. acnes* e atividade anti-inflamatória, apresenta-se como uma estratégia promissora para o tratamento tópico da doença. Assim, ao combinar com sucesso o β CP com nanotecnologia, estabelecemos a base para uma investigação mais aprofundada no estabelecimento de um agente terapêutico com alto potencial e demanda. Dentre as formulações desenvolvidas, as dispersões com coestabilizador mostram-se mais promissoras em função das características físico-químicas e de atividade, sendo a 05-C/ β CF e 07-OC/ β CF, das com a APCL, e a 12-C/ β CF e 15-OC/ β CF, das com BPCL. Mais investigações relacionadas a cinética de liberação, permeação e tempo de residência na pele são necessárias para optar entre as partículas de APCL ou BPCL.

Além disso, mesmo que o projeto tenha sido direcionado para ser vantajoso para o tratamento da acne, ele poderia ser aplicado a qualquer condição que se beneficiasse das múltiplas vias farmacológicas desse bioativo, incluindo também outras formas de administração, como a ingestão ou aplicação intravenosa, cujo potencial já foi verificado em outros trabalhos da literatura científica.

5.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Realizar estudo da cinética de liberação do composto encapsulado por períodos mais longos;
2. Verificar a ação anti-inflamatória e citotóxica das nanopartículas contendo óleo de copaíba;
3. Verificar a atividade antioxidante e sobre a peroxidação lipídica das nanopartículas;
4. Realizar ensaios com sebócitos humanos para verificar o efeito do β CF e das nanopartículas sobre a proliferação celular e a secreção de sebo;
5. Incorporar as dispersões de nanopartículas em uma formulação cosmética para aplicação tópica e avaliar as propriedades físico-químicas, reológicas, a estabilidade e a atividade da formulação;
6. Realizar ensaio de permeação cutânea;

7. Aprofundar os estudos sobre a biocompatibilidade a partir de ensaios com células humanas e de sensibilização cutânea;
8. Desenvolver uma nanopartícula combinando o β CF com outro agente antiacne, como o retinóide Adapaleno, reconhecido por sua eficácia na terapêutica da acne, mas também por causar efeitos adversos, e avaliar essa combinação quanto a características físico-químicas e atividade.

REFERÊNCIAS

ACNEEUOSUNA. **Factores determinantes y tipos de acné. – ACNÉ JUVENIL**. Disponível em: <<https://acneuosuna.wordpress.com/2016/05/09/factores-determinantes-y-tipos-de-acne/>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

AGNER, T. *et al.* Monomer-in-water miniemulsions by membrane emulsification. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 120, p. 251–257, 1 out. 2017.

AL-TAEE, H. *et al.* β -caryophyllene, a dietary phytocannabinoid attenuates oxidative stress, inflammation, apoptosis and prevents structural alterations of the myocardium against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats: An in vitro and in vivo study. **European journal of pharmacology**, v. 858, 2019.

ALMEIDA, K. B. **Desenvolvimento de hidrogel semissólido contendo óleo essencial de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf carregado em nanopartículas poliméricas para o tratamento tópico da herpes**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2014.

ALVAREZ-ROMÁN, R. *et al.* Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53–62, 14 set. 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN, R. *et al.* Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 10, p. 1818–1825, out. 2004b.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. **Polyreactions in miniemulsions** *Progress in Polymer Science (Oxford)* Elsevier Ltd, , 1 maio 2002.

ANTONIO, J. R. *et al.* Nanotechnology in Dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 126–136, 2014.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, 2003.

ATHANASOULIA, I. G. I. *et al.* **The effect of hydroxyapatite nanoparticles on crystallization and thermomechanical properties of PLLA matrix**. Pure and Applied Chemistry. **Anais...**Walter de Gruyter GmbH, 2017.

BAKRY, O. A. *et al.* Immunohistochemical Expression of Cyclo-oxygenase 2 and Liver X Receptor- α in Acne Vulgaris. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 11, n. 9, p. WC01, 1 set. 2017.

BARBIERI, J. S.; WANAT, K.; SEYKORA, J. Skin: Basic Structure and Function. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, p. 1134–1144, 1 jan. 2014.

BARRAT, G. M. 2000, Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, v. 3, 2000.

BARRIOS, J. G. **Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos**. Centro Universitário Franciscano, 2010.

BAUMANN, L. **Cosmetic Dermatology: Principles and Practice**. 2. ed. McGraw-Hill, 2013.

BEGINES, B. *et al.* Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. **Nanomaterials**, v. 10, n. 7, p. 1–41, 2020.

BELLEW, S.; THIBOUTOT, D.; DEL ROSSO, J. Q. Pathogenesis of acne vulgaris: What's new, what's interesting and what may be clinically relevant. **Journal of Drugs in Dermatology**, 2011.

BELTRAME, J. M. *et al.* Covalently Bonded N-Acetylcysteine-polyester Loaded in PCL Scaffolds for Enhanced Interactions with Fibroblasts. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 2, p. 1552–1562, 2021.

BIGA, L. M. *et al.* **Anatomy & Physiology** Oregon, USA OpenStax/Oregon State University, 2003.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 89–100, 2004.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54 Suppl 1, p. 41-55, 2002.

BRUSCHI, M. **Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno avaliação da estabilidade de permeação**. Centro Universitário Franciscano, 2010.

BRUSCHI, M. L. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. In: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Cambridge, UK: [s.n.]. p. 87–194.

BURGESS, D. J. ; HICKEY, A. J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Marcel Dekker Inc, 2002.

BYUN, Y. *et al.* Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 24–28, jan. 2011.

CALLEJA, M. A. *et al.* The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell

activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394–401, 14 fev. 2013.

CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of jojoba and andiroba oils by miniemulsion polymerization. Effect on molar mass distribution. **Macromolecular Symposia**, v. 324, n. 1, p. 114–123, 2013.

CAZO, N. A. *et al.* Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona : preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação Introdução. **Orbital**, v. 4, n. 2, p. 54–76, 2012.

CEBRIÁN, R. *et al.* Control of *Propionibacterium acnes* by natural antimicrobial substances: Role of the bacteriocin AS-48 and lysozyme. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

CHAPPELL, J.; COATES, R. M. Sesquiterpenes. In: **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2010. v. 1p. 609–641.

CHEVALIER, M. T.; GONZALEZ, J.; ALVAREZ, V. Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. **IFMBE Proceedings**, v. 49, p. 187–190, 2015.

CHIARADIA, V. *et al.* Incorporation of superparamagnetic nanoparticles into poly(urea-urethane) nanoparticles by step growth interfacial polymerization in miniemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 596–603, 5 out. 2015.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria**. 9. ed. [s.l.] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COATES, P. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 5, p. 840–848, 2002.

COFFIN, M. D.; MCGINITY, J. W. Biodegradable Pseudolatexes: The Chemical Stability of Poly(D,L-Lactide) and Poly (ε-Caprolactone) Nanoparticles in Aqueous Media. **Pharmaceutical Research** 1992 9:2, v. 9, n. 2, p. 200–205, 1992.

CORDAIN, L. *et al.* Acne vulgaris: a disease of Western civilization. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 12, p. 1584–90, dez. 2002.

COSTA, C. *et al.* Ionic liquid as surfactant in microwave-assisted emulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 1, p. 448–455, 5 jan. 2013.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. Begell House Inc., v.19, n.1, p.99-134, 2002.

CRAPARO, E. F. *et al.* Nanoparticulate Systems for Drug Delivery and Targeting to the Central Nervous System. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 670–677, 2011.

DAHAM, S. S. *et al.* The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 1 jul. 2015.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 28 fev. 2012.

DEGITZ, K. *et al.* **Pathophysiology of acne**JDDG - Journal of the German Society of DermatologyWiley-VCH Verlag, 2007.

DIAS, D. S. *et al.* Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12814–12826, 2014.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

DOWNING, D. T. *et al.* Essential fatty acids and acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 221–225, 1986.

DRÉNO, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, p. 8–12, 2017.

DURÁN, N. .; MATTOSO, L. H. C. .; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação**. 1. ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006.

EUROPEAN DERMATOLOGY FORUM. **S3-Guideline for the Treatment of Acne (Update 2016)**, 2016.

FANG, C. L. *et al.* **Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles**Therapeutic Delivery. Future Science Ltd, 1 set. 2014.

FARIA, M. J. M. DE. **Oleoresina de *Copaifera* spp .: caracterização , verificação da atividade antimicrobiana in vitro e avaliação preliminar de uma formulação em vacas leiteiras com mastite .** [s.l.] Universidade Federal e Goiás, 2014.

FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 27 ago. 2007.

FERREIRA, J. C. C. **Avaliação in vitro da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Cyperus Articulatus* L. em macrófagos**. Universidade Federal do

Oeste do Pará, 2018.

FEUSER, P. E. *et al.* Synthesis of ZnPc loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for photodynamic therapy in leukemic cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 458–466, 1 mar. 2016.

FILIPOWICZ, A. **Acne - Symptoms, Causes, & Natural Treatment Solutions - Holistic Kenko**. Disponível em: <<https://holistickenko.com/acne-get-rid-naturally/>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

FILON, F. L. *et al.* Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 310–322, 2015.

FLORES, F. G. **Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de Melaleuca alternifolia: Desenvolvimento de formulação e atividade biológica**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

FRANCOMANO, F. *et al.* β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, 11 dez. 2019.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313–332, 2 fev. 2005.

GELMINI, F. *et al.* 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, 20 jan. 2013.

GERTSCH, J. Antiinflammatory cannabinoids in diet – towards a better understanding of CB2 receptor action? **Communicative & Integrative Biology**, v. 1, n. 1, p. 26–28, jul. 2008.

GOLLNICK, H. *et al.* Management of acne: A report from a global alliance to improve outcomes in acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 1–37, 1 jul. 2003.

GOLLNICK, H.; FINLAY, A.; SHEAR, N. Can we define acne as a chronic disease? If so, how and when? **American journal of clinical dermatology**, v. 9, n. 5, p. 279–284, 2008.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, 2011.

GOMEZGAETE, C. *et al.* Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 2, p.

153–159, 1 mar. 2007.

GONÇALVES, O. H. *et al.* Biodegradable polymer nanoparticles. In: CHU, C.-C. (Ed.). . **Biodegradable polymers**. [s.l.] © 2015 Nova Science Publishers, Inc, 2016.

GOREN, A. C. *et al.* Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448–453, dez. 2011.

GRUJIC-JOVANOVIC, S. *et al.* Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 2, p. 139–144, 1 mar. 2004.

GUIMARÃES-SANTOS, A. *et al.* Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2012, 2012.

GUINDANI, C. *et al.* Enzymatic ring opening copolymerization of globalide and ϵ -caprolactone under supercritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 404–411, 1 out. 2017.

GUO, K. *et al.* Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 54, n. 1, p. 41–48, 2014.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 9 jan. 2007.

HAMBERGER, A.; LANDFESTER, K. Influence of size and functionality of polymeric nanoparticles on the adsorption behavior of sodium dodecyl sulfate as detected by isothermal titration calorimetry. **Colloid and Polymer Science**, v. 289, n. 1, p. 3–14, jan. 2011.

HANDJANI, R.-M.; RIBIER, A. **Composition for the cosmetic and/or pharmaceutical treatment of upper layers of the epidermis by topical application to the skin, and corresponding preparation process**USA, 2001.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319–327, 2002.

HARVEY, A.; HUYNH, T. T. Inflammation and acne: putting the pieces together. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 13, n. 2, p. 459–463, 2014.

HASSUN, K. M. Acne: etiopathogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, n. 1, p. 7–13, 2000.

HAY, R. J. *et al.* The global burden of skin disease in 2010: An analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1527–1534, 2014.

HAYES, A. W.; KRUGER, C. L. **Hayes' Principles and Methods of Toxicology**. 4. ed. Philadelphia: CRC Press, 2001.

HOLKEM, A. T. *et al.* Preparation techniques of nanotechnology systems applied to food. p. 87–96, 2015.

HU, Y. *et al.* Trans-caryophyllene inhibits amyloid β ($A\beta$) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells. **International Immunopharmacology**, v. 51, p. 91–98, 1 out. 2017.

HUANG, W. C. *et al.* Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 3, p. 232–240, 2014.

ISO. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity**. 3rd. ed., 2009.

JACOBI, U. *et al.* Do follicles play a role as penetration pathways in in vitro studies on porcine skin? - : An optical study. **Laser Physics**, v. 15, p. 1594–1598, 2005.

JENKINS, M. J.; HARRISON, K. L. The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 17, n. 6, p. 474–478, 1 jun. 2006.

JEONG, J. C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 3, p. 249–258, 30 out. 2003.

JEREMY, A. H. T. *et al.* Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 1, p. 20–27, 1 jul. 2003.

JIN, S.; LEE, M. Y. *Kaempferia parviflora* extract as a potential anti-acne agent with anti-inflammatory, sebostatic and anti-propionibacterium acnes activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

JUAN, J. *et al.* Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery. In: **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**. [s.l.] InTech, 2012. p. 201–240.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KANG, S. *et al.* Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo. **American journal of pathology**, v. 166, n. 6, p. 1691–1699, 2005.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNANDEZ-TREJO, N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 3–5, 2005.

KIM, J. *et al.* Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 3, p. 1535–41, 1 ago. 2002.

KLEIN, T. W.; NEWTON, C. A. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 41, p. 395–413, 2007.

KNUTSEN-LARSON, S. *et al.* Acne Vulgaris: Pathogenesis, Treatment, and Needs Assessment. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 99–106, 2012.

KOENIG, M. F.; HUANG, S. J. Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivatives. **Polymer**, 1995.

KOYAMA, S. *et al.* Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, 1 dez. 2019.

KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Transdermal Penetration of Topical Drugs Used in the Treatment of Acne. **Clinical Pharmacokinetics**, 2003.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Naturally occurring antiacne agents. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 9–17, 1 jan. 1994.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LADEMANN, J. *et al.* Hair follicles - A long-term reservoir for drug delivery. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 232–236, jul. 2006.

LADEMANN, J. *et al.* Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.

LADEMANN, J. *et al.* Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, p. 021014, 2009.

LADEMANN, J. *et al.* Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 465–468, 2011.

LADEMANN, J. *et al.* Hair follicles as a target structure for nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2015.

LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, n. 12, p. 896–936, 2001.

LASEK, R. J.; CHREN, M. M. Acne vulgaris and the quality of life of adult dermatology patients. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 454–458, 1998.

LAYTON, A. M. A review on the treatment of acne vulgaris. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 1, p. 64–72, 20 dez. 2006.

LAYTON, A. M.; THIBOUTOT, D.; TAN, J. Reviewing the global burden of acne: how could we improve care to reduce the burden?*. **British Journal of Dermatology**, v. 184, n. 2, p. 219–225, 2021.

LEANDRO, L. M. *et al.* **Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins** *Molecules* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2012.

LEIMANN, F. V. **Nanopartículas híbridas de polímero natural (PHBV)/polímero sintético**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

LEIMANN, F. V. *et al.* Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2082–2088, 1 nov. 2015.

LEIMANN, F. V. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by a miniemulsion/solvent evaporation technique: effect of phbv molar mass and concentration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 369–377, abr. 2013.

LEMOINE, D. *et al.* Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1996.

LERCHE, D. Comprehensive characterization of nano- and microparticles by in-situ visualization of particle movement using advanced sedimentation techniques. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 36, n. July, p. 156–186, 2019.

LERTSATITTHANAKORN, P. *et al.* In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. **International Journal of Aromatherapy**, v. 16, n. 1, p. 43–49, 1 jan. 2006.

LI, Z. J. *et al.* Propionibacterium acnes activates the NLRP3 inflammasome in human sebocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 11, p. 2747–2756, 2014.

LIMA, F. G. S. *et al.* Desenvolvimento e eficácia anti-inflamatória não-clínica de uma formulação anti-acne. **Scientia Plena**, v. 13, n. 02, 7 mar. 2017.

LOOSLI, F.; STOLL, S. Effect of surfactants, pH and water hardness on the surface properties and agglomeration behavior of engineered TiO₂ nanoparticles.

Environmental Science: Nano, v. 4, n. 1, p. 203–211, 20 jan. 2017.

LOPALCO, A. *et al.* Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: Development and permeability studies across in vitro models of the blood–brain barrier and human placental trophoblast. **International Journal of Nanomedicine**, 2015.

LOSA, C. *et al.* Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 1, p. 80–87, 1993.

LÜ, J. M. *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 4, p. 325–341, 2009.

LUM GMBH. **Stability: The NEXT STEP® in Dispersion Analysis**. 2020.

LV, Q. *et al.* Crystallization of poly(3-caprolactone) in its immiscible blend with polylactide: insight into the role of annealing histories. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 37721–37730, 2016.

MACHADO, K. DA C. *et al.* A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 12, p. 2376–2388, 1 dez. 2018.

MACHADO, T. O. **Synthesis of poly(thioether-ester) nanoparticles derived from renewable resources via thiol-ene polymerization in miniemulsion da Universidade Federal de Santa Catarina**, 2015.

MACHADO, T. O. *et al.* Thiol-ene miniemulsion polymerization of a biobased monomer for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 509–517, 1 nov. 2017.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAGIN, P. *et al.* Psychological sequelae of acne vulgaris: Results of a qualitative study. **Canadian Family Physician**, v. 52, n. 8, p. 978–979, 2006.

MALLON, E. *et al.* The quality of life in acne: A comparison with general medical conditions using generic questionnaires. **British Journal of Dermatology**, v. 140, n. 4, p. 672–676, 1999.

MARANGON, C. A. **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana/gelatina/óleo de copaíba**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

MASSON, D. S. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, n. 1, p. 664–669, 2013.

MELLO, V. A.; RICCI-JÚNIOR, E. Encapsulation of naproxen in nanostructured system: structural characterization and in vitro release studies. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 933–939, 2011.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2 B, p. 577–581, 2009.

MOINARD-CHÉCOT, D. *et al.* Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, n. 2, p. 458–468, 15 jan. 2008.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Structure and function of skin. In: **Toxicology of the Skin**. New York: Informa Healthcare, 2010. p. 1–18.

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

MOSQUEIRA, V. C. F. *et al.* Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, 1 maio 2000.

MUSYANOVYCH, A. *et al.* Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 2, p. 127–139, 2008.

NASRI, H. *et al.* Medicinal Plants for the Treatment of Acne Vulgaris : A Review of Recent Evidences. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 11, 2015.

NEVES, J. K. DE O. *et al.* Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 185–192, 1 jan. 2018.

NEVES, J. R. *et al.* Propionibacterium acnes and bacterial resistance. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 7, n. 3, p. 27–38, 2015.

NOBBMANN, U. **Derived count rate – what is it?** Malvern Panalytical - Materials Talks, 2015.

OLÁH, A. *et al.* Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 9, p. 3713–3724, 2 set. 2014.

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance raw materials: Caryophyllene. **Food and cosmetics toxicology**, v. 11, p. 1059–1060, 1973.

OTTAVIANI, M.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Lipid mediators in acne. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 25 ago. 2010.

OURIQUE, A. F. *et al.* Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 1–4, 20 mar. 2008.

PACHECO, C. C. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo de Copaifera reticulata Ducke**. Universidade Federal do Amazonas, 2014.

PAPAKOSTAS, D. *et al.* **Nanoparticles in dermatology** *Archives of Dermatological Research*, out. 2011.

PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 146–161, 2005.

PASWAN, S. K.; SAINI, T. R. Purification of Drug Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Emulsification Solvent Evaporation Using Stirred Cell Ultrafiltration Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 12, p. 2779–2786, 1 dez. 2017.

PATROCINIO, V. M. B. *et al.* High Molecular Weight Polystyrene Obtained by Cationic Emulsion Polymerization Catalyzed by Imidazolium-Based Ionic Liquid. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 13, n. 2, p. 1800061, 1 abr. 2019.

PATZELT, A. *et al.* Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011.

PATZELT, A.; LADEMANN, J. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. **Expert Opinion on Drug Delivery**. Taylor and Francis Ltd, 2020.

PAWIN, H. *et al.* Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. **European Journal of Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 4–12, 1 jan. 2004.

PEREIRA, I. *et al.* Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1–2, p. 261–270, 5 out. 2018.

PEREIRA, R. L. *et al.* Hydrogel containing adapalene- and dapsone-loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, in vitro irritation and permeation studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 12, p. 2001–2008, 2016.

PERES, L. B. **Obtenção de nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para incorporação de um análogo da isoniazida**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

PERES, L. B. *et al.* Preparation of PLLA/PMMA and PLLA/PS binary blend nanoparticles by incorporation of PLLA in methyl methacrylate or styrene miniemulsion homopolymerization. **Polímeros**, v. 25, n. 1, p. 23–28, 1 jan. 2015.

PERES, L. B. *et al.* PLLA/PMMA blend in polymer nanoparticles: influence of processing methods. **Colloid and Polymer Science** 2017 **295:9**, v. 295, n. 9, p. 1621–1633, 4 jul. 2017.

PERES, M. C. **Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de *Xylopia aromatica* Lamm. e sua atividade frente a oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleroydidae) biótipo B.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2015.

PETERLE, J. P. *et al.* Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified β -caryophyllene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 148, 2020.

PIERI, F. A. *et al.* Antimicrobial profile screening of two oils of copaifera genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241–244, fev. 2012.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Copaiba oil (*Copaifera* sp.): History, extraction, industrial applications and medicinal properties. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PRAKASH, C. *et al.* Skin surface pH in acne. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 10, n. 7, p. 33–39, 2017.

PROW, T. W. *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews journal**, v. 63, p. 470–491, 2011.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal plants and the human needs. **Journal of Herbmед Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1–2, 1 dez. 2012.

RAI, M. *et al.* Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles : Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, p. 67–78, 2017.

REIS, C. P. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

REZENDE, S. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RIBEIRO, B. DE M. *et al.* Etiopathogeny of acne vulgaris: a practical review for day-to-day dermatologic practice. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 3, p. 20–26, 2015.

ROBERTS, M. S. *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017.

ROCO, M. C. *et al.* The Long View of Nanotechnology Development: The National Nanotechnology Initiative at 10 Years. In: **Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020**. [s.l.] Springer Netherlands, 2011. v. 1p. 1–28.

ROLLAND, A. *et al.* Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 12, p. 1738–1744, 1993.

ROSADO, C.; SILVA, C.; REIS, C. P. Hydrocortisone-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 3, p. 710–718, 2013.

SADHASIVAM, S. *et al.* Heterogeneity and antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes* isolates and its therapeutic implications: blurring the lines between commensal and pathogenic phylotypes. **Dermatologic Therapy**, v. 29, n. 6, p. 451–454, 1 nov. 2016.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

SANTOS, P. S. *et al.* β -caryophyllene Delivery Systems: Enhancing the Oral Pharmacokinetic and Stability. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 29, p. 3440–3453, 2018.

SARACENO, R. *et al.* **Emerging applications of nanomedicine in dermatology** *Skin Research and Technology*, fev. 2013.

SATO, T. T. *et al.* **Acne Vulgaris treating**. Número da patente: 5,200,429 USA, 1993.

SCHAEFER, H.; LADEMANN, J. The role of follicular penetration. A differential view. **Skin pharmacology and applied skin physiology**, v. 14 Suppl 1, p. 23–27, 2001.

SCHAEFER, U. F.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W. Hair Follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19 n. 4, p. 432-436, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHLEGEL, I. *et al.* Crystallinity Tunes Permeability of Polymer Nanocapsules. **Macromolecules**, v. 50, n. 12, p. 4725–4732, 27 jun. 2017.

SCHMIDT, J. M. *et al.* Abaco bush medicine: Chemical composition of the essential oils of four aromatic medicinal plants from Abaco Island, Bahamas. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 12, n. 3, p. 43–65, 2006.

SHALITA, A. The integral role of topical and oral retinoids in the early treatment of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. SUPPL. 3, p. 43–49, 2001.

SHARMA, C. *et al.* Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 15 mar. 2016.

SINHA, V. R. *et al.* **Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview** **International Journal of Pharmaceutics**, 18 jun. 2004.

SKÖLD, M. *et al.* The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538–545, abr. 2006.

TANGHETTI, E. A. The role of inflammation in the pathology of Acne. **Clinical Aesthetic**, v. 6, n. 9, p. 27–35, set. 2013.

THIBOUTOT, D. *et al.* New insights into the management of acne: An update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne Group. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 5 SUPPL. 1, maio 2009.

TOIGO, R. L. P. **Desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade de nanopartículas contendo adapaleno e dapsona para aplicação cutânea**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

TOMA, H. E. Research organization in Brazil: From chemistry to nanotechnology. **Quimica Nova**, v. 28, n. SUPPL., p. 48–51, 2005.

TÓTH, K. F. *et al.* Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. **Molecules**, v. 24, n. 5, 2019.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: como Produzí-las em Escala Industrial**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

TUBA, F.; OLÁH, L.; NAGY, P. Towards the understanding of the molecular weight dependence of essential work of fracture in semi-crystalline polymers: A study on poly(ϵ -caprolactone). **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 869–879, 2014.

TUCHAYI, S. M. *et al.* Acne vulgaris. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15029, 17 set. 2015.

VEIGA, V. F. *et al.* Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 476–480, 2001.

VEIGA, V. F. O gênero copaifera L. **Química Nova**, 2002.

VEIGA, V. F. *et al.* 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**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 13 jun. 2007.

VELDHUIZEN, E. J. A. *et al.* Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874–1879, 8 mar. 2006.

VENERAL, J. G. **Produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em reator de leito empacotado utilizando fluido pressurizado**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 6, n. 9, p. 27–35, 2013.

WANG, L. L. *et al.* Pharmacological activation of cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation, fibrogenesis, and promotes re-epithelialization during skin wound healing. **European Journal of Pharmacology**, v. 786, p. 128–136, 2016.

WANG, W. *et al.* Polyethylene nano crystalsomes formed at a curved liquid/liquid interface. **Nanoscale**, v. 10, n. 1, p. 268–276, 7 jan. 2018.

WEISS-ANGELI, V. *et al.* Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet a radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, n. 1, p. 80–89, 2008.

WOODRUFF, M. A.; DIETMAR, H. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dermal absorption**. [s.l.] World Health Organization, 2006.

YOO, H. J.; JWA, S. K. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**, v. 88, p. 42–46, 1 abr. 2018.

YU, W. *et al.* A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, n. 2, p. 139–146, 15 jan. 1993.

ZAENGLEIN, A. L. *et al.* Guidelines of care for the management of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 945–973, 1 maio 2016.

ZANETTI, M. **Production and characterization of nanocapsules of geraniol cinnamate and its evaluation as possible antimicrobial additive**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 428–440, 20 dez. 2018.

ZOUBOULIS, C. C. Acne and sebaceous gland function. **Clinics in Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 360–366, 2004.

APÊNDICE A - Estudo prévio das formulações

O procedimento, condições e formulação dos trabalhos de Musyanovych *et al.* (2008), Leimann (2011) e Peres (2012) serviram como base para chegar nas formulações desse trabalho e incorporação do β -cariofileno e do óleo de copaíba nas dispersões de nanopartículas pelo método de miniemulsificação e evaporação do solvente.

Partindo dessas referências, algumas modificações foram avaliadas, primeiramente para o polímero de maior massa molar, APCL (80 kDa) e, posteriormente, para o polímero de menor massa molar, BPCL (12,5 kDa) com o intuito de melhorar as características das partículas, objetivando, principalmente, obter um tamanho de partícula entre 200 e 500 nm, que, segundo Handjani e Ribier (2001) e Lademann *et al.* (2011), evidenciam um melhor desempenho para a aplicação tópica via folículo pilosebáceo. Para todos os testes foram mantidos 24 g de água destilada.

Formulação e condição de sonificação	
	Massa (g)
Polímero	0,3
Clorofórmio	10
SDS	0,7%FD*
Água	24
Sonificação	
Amplitude	70%
Tempo	3 min
Regime de pulso	30 s <i>on</i> e 10 s <i>off</i>

*FD: Fase dispersa
Fonte: Autora (2021)

A1. Polímero de maior massa molar, APCL, 80 kDa

Teste 1. Influência da **concentração de APCL**, definida em relação a massa de solvente, em formulações com 0,7%_m do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) em relação a fase dispersa - FD (10 g de clorofórmio + massa de APCL).

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s *on*; 10 s *off*.

Composição das dispersões testadas:

Quantidade

APCL	6, 4,5 ou 3% _m CHCl ₃
Clorofórmio	10 g
SDS	0,7% _m FD
Água	24 g

Tabela A 1 - Resumo das composições e resultados para o Teste 1.

Amostra	APCL	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultado/Observações
19	6%	284,4	0,521	-	-	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, porém, distribuição do tamanho de gotas multimodal, com elevado PDI.
21	4,5%	211,2	0,233	173,8	0,198	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas monodispersa, porém ocorreu formação de grumos e aglomerados do polímero após evaporação do solvente.
1	3%	166,3	0,150	162,9	0,136	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição de tamanhos de partículas monomodal e com baixo PDI (distribuição estreita).

Fonte: Autora (2021).

Teste 2. Influência do aumento da quantidade de **solvente para 16 g**, visando verificar se o aumento da fase dispersa resultaria em partículas maiores, em formulação com 0,7%_m de SDS em relação a fase dispersa, contendo, ou não, 20%_m do coestabilizador crodamol em relação ao polímero.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s on; 10 s off

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	4,5 ou 3% _m CHCl ₃
Crodamol	0 ou 20% _m APCL
Clorofórmio	16 g
SDS	0,7% _m FD
Água	24 g

Tabela A 2 - Resumo das composições e resultados do Teste 2.

Amostra	APCL	Crodamol I (% _m APCL)	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultado/Observações
20	3%	-	206,1	0,188	164,2	0,169	Estabilizou a dispersão, porém não aumentou o diâmetro médio das partículas, comparando com a dispersão 1, com 10 g de solvente.

23	3%	20	208,1	0,198	199,5	0,302	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de gotas monodispersa, porém, aglomerou parte do polímero após evaporação do solvente.
24	4,5%	-	122,9	0,488	229,4	0,416	Distribuição do tamanho de gotas e partículas multimodal. Aglomerou polímero após evaporação do solvente.
25	4,5%	20	300,6	0,286	276,1	0,298	Coestabilizador auxiliou na diminuição do PDI, comparando-se com a amostra 24 , porém o sistema ainda apresentou gotas e partículas multimodais e aglomerou polímero após evaporação do solvente.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Testes 1 e 2:

Para as condições testadas, a maior concentração de APCL capaz de proporcionar uma dispersão de nanopartículas estável e monomodal é de 3%_{mCHCl₃}, tanto em relação a 10 ou 16 g de solvente. Desse modo, definiu-se que a fase dispersa das dispersões com APCL seria constituída por 10 g de solvente e 0,3 g de APCL.

Teste 3. Influência da **concentração dos surfactantes não iônicos** em relação a fase dispersa (10 g clorofórmio + 3 g APCL). Foram testados o **par de surfactantes, Tween 80 e Span 80** e apenas **Tween 80**. Para se obter um HLB de 12, os surfactantes foram utilizados nas razões 72% Tween 80 e 28% Span 80.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	0,3 g
Crodamol	0 ou 0,06 g
Clorofórmio	10 g
Surfactante	2,5, 5, 10, 20 ou 25% _{mFD}
Span 80	0,28*Surfactante
Tween 80	0,72*Surfactante ou 1
Água destilada	24 g

Tabela A 3. Resumo das composições e resultados do Teste 3.

Amostra	Surfactante (% _{mFD} / tipo)	Crodamol (% _{APCL})	Resultado/Observações
---------	--	----------------------------------	-----------------------

4	2,5 / Tween 80 e Span 80	-	Não dispersou/Separação de fases
5	5 / Tween 80 e Span 80	-	Não dispersou/Separação de fases
6	10 / Tween 80 e Span 80	-	Não dispersou/Separação de fases
7	10 / Tween 80	-	Não dispersou/Separação de fases
8	20 / Tween 80 e Span 80	-	Não dispersou/Separação de fases
9	20 / Tween 80	-	Não dispersou/Separação de fases
11	25 / Tween 80	20	Não dispersou/Separação de fases

Fonte: Autora (2021).

Teste 4. Influência da adição de **20% de coestabilizador**, crodamol, em relação ao polímero e variação do solvente (**clorofórmio (CHCl₃) ou diclorometano (CH₂Cl₂)**) na condição de maior concentração de surfactante testada, 25%_m em relação a fase dispersa, sendo 72%_m de Tween 80 e 28%_m de Span 80 e com variação do **tempo de sonificação**.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Massa (g)
APCL	0,3
CHCl ₃ ou CH ₂ Cl ₂	10
Crodamol	0,06
Surfactante	2,59
Span 80	1,86
Tween 80	0,72
Água	24

Tabela A 4 - Resumo das composições e resultados do Teste 4.

Amostra	Solvente	Tempo de Sonificação (min)	Resultado/Observações
12	CHCl ₃	3	Não dispersou/Separação de fases.
12.1	CHCl ₃	5	Não dispersou/Separação de fases.
14	CH ₂ Cl ₂	3	Não dispersou/Separação de fases.
14.2	CH ₂ Cl ₂	5	Não dispersou/Separação de fases.

Fonte: Autora (2021).

Teste 5. Dispersões com o surfactante Pluronic na concentração de 7%_m em relação a fase dispersa ou Lutensol AT11 e AT 50 na concentração de 10%_m em relação a

fase dispersa, com 20% do coestabilizador crodamol e tempo de sonificação de 3 ou 5 min.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Massa (g)
APCL	0,3
Clorofórmio	10
Crodamol	0,06
Pluronic ou Lutensol	0,72 ou 1,04
Água	24

Tabela A 5 - Resumo das composições e resultados do Teste 5.

Amostra	Surfactante (% _{mFD} / tipo)	Tempo sonificação (min)	Resultado/Observações
36	7 / Pluronic	3	Separação de fases após sonificação.
36.2	7 / Pluronic	5	Distribuição do tamanho de gotas multimodal.
37	10 / Lutensol AT11	3	Não dispersou.
37.2	10 / Lutensol AT11	5	Separação de fases após sonificação.
40	10 / Lutensol AT50	3	Não dispersou.
40.2	10 / Lutensol AT50	5	Separação de fases após sonificação.

Fonte: Autora (2021).

Teste 6. Utilização do **ultraturrax** para fazer a pré-emulsão antes de dispersar com a sonda ultrassônica, por 2 min e 8000 rpm. Foi testada uma formulação com 15% do par de surfactantes Tween 80 (72%) e Span 80 (28%) em relação a fase dispersa e uma formulação com 20% de Lutensol AT50 em relação a fase dispersa, contendo 0,3 g de polímero, 0,3 g do coestabilizador crodamol (100%_{APCL}) e 10 g de clorofórmio.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	0,3 g
Clorofórmio	10 g
Crodamol	0,3 g
Tween80/Span 80 ou Lutensol AT50	15% _{mFD} OU 20% _{mFD}

Água	24 g
------	------

Tabela A 6 - Resumo das composições e resultados do Teste 6.

Amostra	Surfactante (% _m FD / tipo)	Resultado/Observações
68	15 / Tween 80 e Span 80	Separação de fase após sonificação.
69	20 / Lutensol AT50	Separação de fase após sonificação.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão para os Testes 3 a 6:

Nenhuma das condições testadas possibilitou a utilização de surfactantes não-iônicos para a obtenção de dispersões estáveis pelo método de miniemulsificação-evaporação do solvente, mesmo em elevadas concentrações, com a utilização de 100% de coestabilizador em relação ao polímero e utilização do Ultraturrax para realizar a pré-dispersão. Por essa razão, definiu-se o surfactante aniônico, SDS, como surfactante das dispersões.

Musyanovych *et al.* (2008) e Peres (2012), obtiveram resultados semelhantes, mostrando que surfactantes iônicos foram mais eficientes na estabilização do que os não-iônicos, pois com menor quantidade resultam em nanopartículas com menores diâmetros médios e miniemulsões estáveis.

Teste 7. Influência da **quantidade de surfactante SDS em relação a fase dispersa**, composta por 3 g de APCL, 10 g do solvente CHCl₃ e crodamol, quando presente, na composição de 20%_m em relação ao polímero.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	0,3 g
Crodamol	0 ou 0,6 g
Clorofórmio	10 g
SDS	0,35, 0,5, 0,6 ou 0,7% _m FD
Água	24 g

Tabela A 7 - Resumo das composições e resultados do Teste 7.

SDS (% _m FD)	Crodamol (% _m APCL)	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultados/Observações
----------------------------	-----------------------------------	------------------------	-----	------------------------	-----	------------------------

3	0,35	-	250,0	0,333	-	-	Distribuição do tamanho de gotas multimodal e formação de grumos de polímero após evaporação do solvente.
16	0,50	-	104,4	0,498	-	-	Separação do polímero no fundo após sonificação, distribuição do tamanho de gotas multimodal.
17	0,50	20	51,7	0,363	-	-	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, porém, distribuição do tamanho de gotas multimodal.
18	0,60	-	55,2	0,424	-	-	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, porém, distribuição do tamanho de gotas multimodal.
1	0,70		166,3	0,150	162,9	0,136	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas monomodal e com baixo d_p e PDI.
10	0,70	20	177,8	0,183	167,4	0,183	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 7:

A quantidade mínima de surfactante necessária para estabilizar o sistema com 0,3 g de APCL foi 0,7%_m em relação a fase dispersa.

Teste 8. Influência do **tempo de sonificação** em formulações com 0,7%_m de SDS em relação a fase dispersa, composta por 3 g de APCL, 10 g do solvente CHCl₃ e crodamol, quando presente, na composição de 20% em relação ao polímero.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	0,3 g
Crodamol	0 ou 0,06 g
Clorofórmio	10 g
SDS	0,7% _{mFD}
Água	24 g

Tabela A 8 - Resumo das composições e resultados do Teste 8.

Tempo de sonificação (min)	Croda mol (% _{mAPCL})	d_G (nm)	PDI	d_P (nm)	PDI	Resultados/Observações
----------------------------	---------------------------------	------------	-----	------------	-----	------------------------

1	3	-	166,3	0,150	162,9	0,136	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho partículas monomodal e com baixo d_p e PDI.
28	2	-	163,7	0,156	156,4	0,134	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho partículas monomodal e com baixo d_p e PDI.
2	1	-	181,0	0,187	176,9	0,194	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
27	1	-	225,6	0,188	212,3	0,189	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
10	3	20	177,8	0,183	167,4	0,183	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
22	3	20	240,7	0,241	182,3	0,200	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
26	2	20	228,2	0,183	226,5	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
29	2	20	212,0	0,219	208,8	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 8:

Analisando os resultados descritos acima, para as dispersões sem coestabilizador, os resultados de diâmetro e PDI das nanopartículas das dispersões com 3 e 2 min de sonificação, **1** e **28**, foram muito similares, enquanto para as dispersões **2** e **27**, submetidas a sonificação por 1 min, o tamanho e o PDI aumentaram, o que é esperado devido à menor energia empregada aos sistemas. Para as dispersões contendo o coestabilizador, simulando a encapsulação dos ativos, mesmo que em uma baixa concentração (20%_{mAPCL}), as realizadas com 2 e 3 min de sonificação apresentaram PDI menores que 0,2, indicando uma distribuição estreita e homogênea dos tamanhos das partículas, no entanto, as dispersões sonificadas por 2 min, resultaram em partículas maiores. Como um dos objetivos dos estudos prévios era definir condições para se obter nanopartículas maiores e com distribuição estreita para posterior incorporação dos ativos nas formulações, foi definido o tempo padrão de sonificação de 2 min, uma vez que esse tempo foi suficiente para obter partículas com diâmetros maiores e com baixo PDI para as formulações contendo o

coestabilizador. Além disso, uma menor energia é interessante considerando uma ampliação de escala, dado que a elevada demanda energética no processo de sonificação é uma das limitações dessa técnica.

Teste 9. Influência do tipo de solvente, **diclorometano ou clorofórmio**, em formulações com 0,7%_m de **SDS em relação a fase dispersa**, composta por 3 g de APCL, 10 g do solvente CHCl_3 e 20%_m do coestabilizador crodamol em relação ao polímero.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 3 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Massa (g)
APCL	0,3
Crodamol	0,06
CHCl_3 ou CH_2Cl_2	10
SDS	0,072
Água	24

Tabela A 9 - Resumo das composições e resultados do Teste 9.

Amostra	Solvente	d_G (nm)	PDI	d_P (nm)	PDI	Resultados/Observações
26	CHCl_3	235,1	0,194	226,5	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
29	CHCl_3	212	0,219	208,8	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
30	CH_2Cl_2	194,9	0,159	190,5	0,172	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição estreita do tamanho de partículas.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 9:

Para ambos os solventes testados o PDI obtido caracteriza dispersões estreitas, porém, as dispersões com diclorometano apresentaram diâmetros de partícula menores que as com clorofórmio. Assim, tendo em vista a obtenção de dispersões de nanopartículas com diâmetros na faixa de 200 a 300 nm o clorofórmio foi mantido como solvente, assim como nos trabalhos de referência realizados por Leimann (2011) e Peres (2012). Esse comportamento pode estar associado a propriedades físico-químicas como a miscibilidade do solvente na água, a solubilidade

do polímero no solvente e a viscosidade da fase orgânica, indicando que o solvente também influencia na estabilidade e tamanho das nanopartículas. Dentre essas propriedades sabe-se que o clorofórmio tem menor solubilidade que o diclorometano em água, o que poderia resultar em uma maior tensão interfacial entre as fases orgânica e aquosa, e a coalescência de algumas gotas, levando a formação de partículas maiores (LEIMANN, 2011).

Teste 10. Influência da **amplitude de sonificação** nas dispersões de nanopartículas em formulações com 0,7%_m de SDS em relação à fase dispersa, composta por 3 g de APCL, 10 g de clorofórmio e 0,06 g do coestabilizador crodamol (20%_mAPCL)

Condição de sonificação: 2 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Massa (g)
APCL	0,3
Crodamol	0,06
Clorofórmio	10
SDS	0,072
Água	24

Tabela A 10 - Resumo das composições e resultados do Teste 10.

Amostra	Amplitude	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultados/Observações
26	70%	235,1	0,194	226,5	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
29	70%	212,0	0,219	208,8	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
13	50%	265,6	0,275	276,2	0,255	Dispersões com aspecto leitoso e homogêneo, diâmetro de partículas e PDIs maiores, indicando uma distribuição do tamanho de partícula mais larga quando comparado às dispersões com 70% amplitude.
31	50%	272,0	0,211	247,7	0,225	

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 10:

O objetivo dos ensaios com menor amplitude de sonificação era o aumento do tamanho das partículas, no entanto para as dispersões **13** e **31**, com amplitude de 50%, apesar de resultar em partículas maiores, também apresentaram maiores índices de polidispersão (PDI), indicando uma maior heterogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, quando comparadas às dispersões **26** e **29**. Por essa razão, definiu-se a amplitude de sonificação de 70%, visando a obtenção de dispersões mais homogêneas em tamanho de partícula o que é desejável para uma liberação também mais homogênea de ativos, quando esses são inseridos na formulação.

Teste 11. Influência da **quantidade do coestabilizador crodamol**, simulando a encapsulação dos ativos β -cariofileno e óleo de copaíba, em formulações com 0,7% de SDS em relação à fase dispersa, composta por 3 g de APCL, 10 g de clorofórmio e crodamol.

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 2 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
APCL	0,3 g
Crodamol	20, 30, 40, 50 OU 100%APCL
Clorofórmio	10 g
SDS	0,7% _m FD
Água	24 g

Tabela A 11 - Resumo das composições e resultados do Teste 11.

	Crodamol (% _{APCL})	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultados/Observações
26	20	235,1	0,194	226,5	0,180	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
29	20	212,0	0,219	202,5	0,186	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita.
34	30	230,5	0,214	216,2	0,228	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição mais larga.
32	40	261,2	0,201	230,6	0,240	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição mais larga, com pequena moda de partículas com maior diâmetro.

35	50	241,6	0,228	234,3	0,241	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas mais larga, mas monomodal.
41	100	182,8	0,178	176,9	0,182	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita e monomodal.
43	100	198,4	0,211	188,2	0,198	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição do tamanho de partículas estreita e monomodal.

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 11:

O aumento da concentração do crodamol nas formulações resultou no aumento do tamanho e do PDI das nanopartículas até a concentração de 50%_m em relação ao polímero. No entanto, a presença de 100%_m do crodamol em relação ao polímero levou ao estreitamento da distribuição, com nanopartículas com tamanho e PDI menores, devido à sua ação na coestabilização das gotas, minimizando a degradação difusional.

Uma vez que, nas condições testadas, a adição de 0,3 g de crodamol na fase dispersa resultou em dispersões monodispersas, com diâmetro médio de aproximadamente 200 nm e baixo PDI, definiu-se que as dispersões contendo os ativos também seriam de 100%_mAPCL, variando-se apenas a proporção β-cariofileno:óleo de copaíba e β-cariofileno:crodamol.

A2. Polímero de menor massa molar, BPCL, 12,5 kDa

Para manter condições similares às aquelas utilizadas para o preparo das dispersões com o polímero de maior massa molar, foram testadas duas situações, mantendo-se fixas a condição de sonificação, com amplitude de 70%, por 2 min e pulso de 30 s on e 10 s off; a quantidade de solvente, 10 g de clorofórmio; a quantidade de água, 24 g; e 100% de crodamol em relação ao polímero, simulando a posterior incorporação dos ativos β-cariofileno e óleo de copaíba.

Teste 12. Influência da **quantidade de surfactante SDS em relação a fase dispersa**, composta por 3 g de BPCL, 10 g do solvente CHCl₃ e 3 g de crodamol (100%_mBPCL).

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 2 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
BPCL	0,3 g
Crodamol	0,3 g
Clorofórmio	10 g
SDS	0,70, 0,35, 0,175 OU 0,09% _{mFD}
Água	24 g

Tabela A 12 - Resumo das composições e resultados do Teste 12.

Amostra	SDS (% _{mFD})	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultados/Observações
45	0,70	121,5	0,134	*	*	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, gotas com diâmetro e PDI pequenos.
47	0,35	146,3	0,128	*	*	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, gotas com diâmetro e PDI pequenos.
48	0,175	147,2	0,148	*	*	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, gotas com diâmetro e PDI pequenos.
49	0,09	161,5	0,158	142,1	0,107	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, gotas e nanopartículas com diâmetro e PDI pequenos.

*Não foi evaporado o solvente, pois as gotas estavam muito pequenas

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 12:

Uma vez que o polímero BPCL possui uma massa molar aproximadamente 6,5 vezes menor que o APCL, a solubilidade dele no solvente é maior e as formulações com apenas 3 g de polímero resultaram em dispersões de nanopartículas muito pequenas para a aplicação desejada. E, mesmo reduzindo ao máximo a quantidade de surfactante utilizado, o diâmetro e o PDI aumentaram pouco.

Teste 13. Influência da **concentração de BPCL**, definida em relação a massa de solvente, em formulações com 0,7%_m de SDS em relação a fase dispersa, composta pelo polímero BPCL, 10 g de clorofórmio e o coestabilizador, crodamol (100%_{mBPCL}).

Condição de sonificação: Amplitude de 70%; 2 min; Pulso: 30 s on; 10 s off.

Composição das dispersões testadas:

	Quantidade
BPCL	3, 9, 15 ou 20% _{mCHCl3}
Crodamol	100% _{mBPCL}

CHCl ₃	10 g
SDS	0,7% _{mFD}
Água	24 g

Tabela A 13 - Resumo das composições e resultados do Teste 13.

	BPCL	BPCL e Crodamol (g)	d _G (nm)	PDI	d _P (nm)	PDI	Resultado/Observações
47	3%	0,3	146,3	0,128	*	*	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, gotas com diâmetro e PDI pequenos
51	9%	0,9	149,4	0,124	138,8	0,131	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, nanopartículas com diâmetro e PDI pequenos
57	15%	1,5	198,2	0,153	187,0	0,170	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, tamanho e PDI das nanopartículas similares as dispersões com APCL
58	15%	1,5	174,2	0,147	174,5	0,136	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, tamanho das nanopartículas similares as dispersões com APCL
59	15%	1,5	175,7	0,133	174,7	0,136	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, tamanho das nanopartículas similares as dispersões com APCL
53	20%	2,0	226,6	0,219	229,9	0,235	Aspecto da dispersão leitoso e homogêneo, distribuição mais larga, com pequena moda de partículas com maior diâmetro

*Não foi evaporado o solvente, pois as gotas estavam muito pequenas

Fonte: Autora (2021).

Conclusão Teste 13:

O diâmetro médio das nanopartículas aumentou com o aumento da concentração de polímero. As dispersões **47** e **51**, com 3 e 9 g de BPCL, respectivamente, apresentaram diâmetros de gota e de partícula abaixo do que estava sendo buscado, considerando a aplicação. Enquanto a dispersão com 20% de BPCL (**53**) apresentou tamanho dentro da faixa desejada, porém com um PDI mais elevado, representando uma distribuição de tamanho de partículas mais larga. Quando esse estudo com o polímero de maior massa molar foi realizado, já possuíamos alguns resultados referentes a incorporação dos ativos no polímero de maior massa molar e

já havia sido constatado que o crodamol é um bom coestabilizador para esse sistema e gera nanopartículas menores e com menor PDI, quando comparo as dispersões com β CF e OC, por isso, definiu-se como concentração de trabalho 15% de BPCL em relação aos 10 g de clorofórmio, o equivalente a 1,5 g, para evitar índices de polidispersão elevados quando se incorporasse o β -cariofileno e óleo de copaíba nas formulações.

APÊNDICE B - Perfis de transmissão das dispersões de nanopartículas

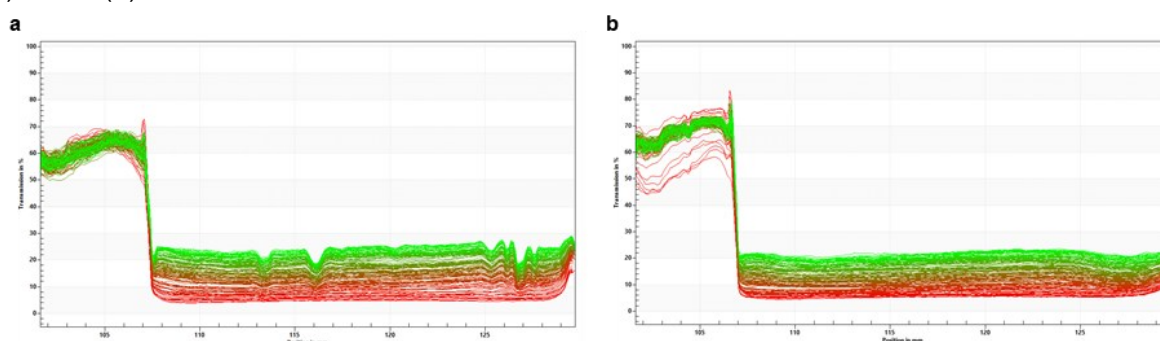
Tabela B.1 – Composição e valor de índice de separação das dispersões com APCL. Ensaio realizado por LUMSizer® (4000 rpm e 1,04 h) das dispersões com teor de sólidos de 0,2%_m.

	01 – βCF	02 – βCF	03 – C	04 – C/βCF	05 – C/βCF	06 – OC	07 – OC/βCF	08 – OC/βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
Índice de Separação	0,21 ± 0,02 ^b	0,32 ± 0,16 ^b	0,21	0,10	0,03 ± 0,02 ^c	0,29 ± 0,07 ^b	0,04	0,28 ± 0,05 ^b

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo/APCL}); ^b valor médio de duplicata e ^c valor médio de triplicata.

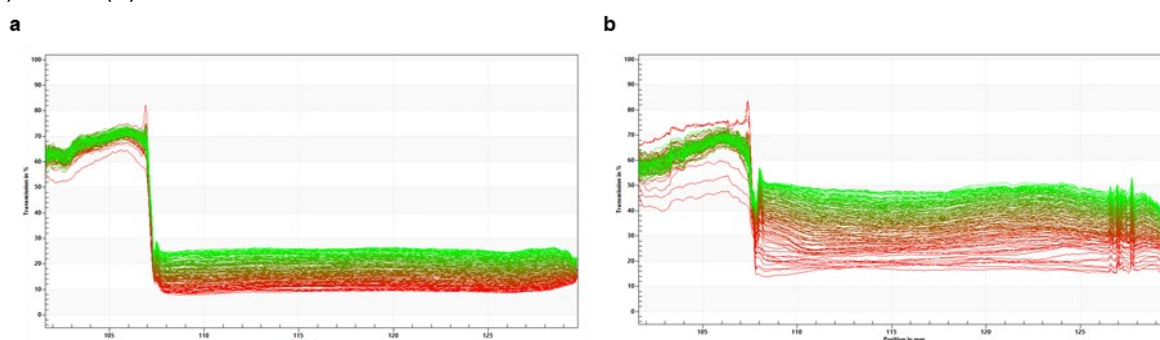
Fonte: Autora (2021).

Figura B1 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **01-βCF** com índices de separação 0,22 (a) e 0,20 (b).



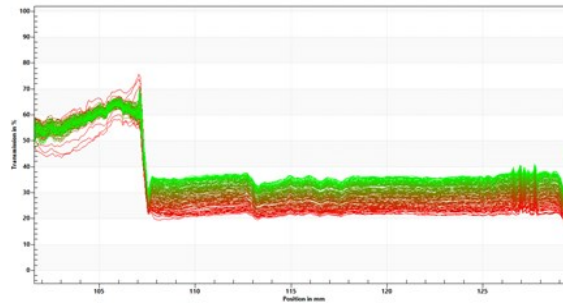
Fonte: Autora (2021).

Figura B.2 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **02-βCF** com índices de separação 0,20 (a) e 0,44 (b).



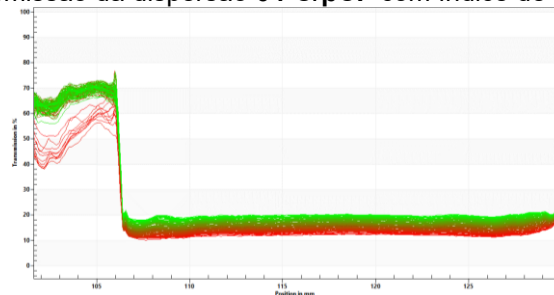
Fonte: Autora (2021).

Figura B.3 - Perfis de transmissão da dispersão **03-C** com índice de separação 0,21.



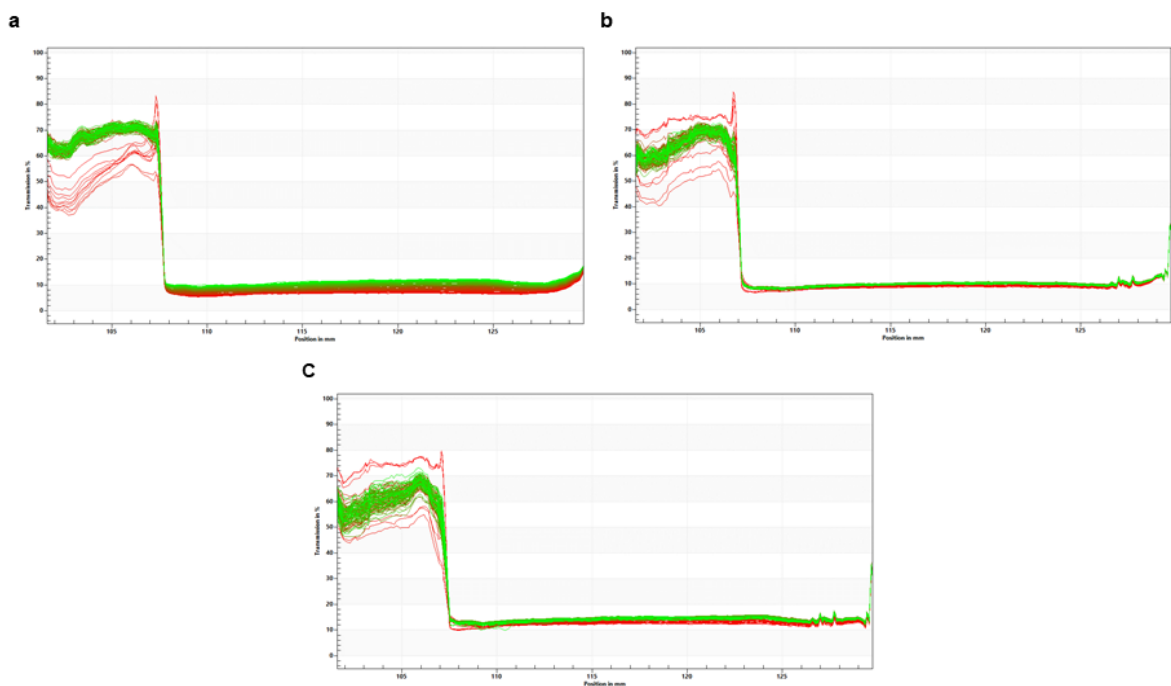
Fonte: Autora (2021).

Figura B.4 - Perfis de transmissão da dispersão **04-C/βCF** com índice de separação 0,10.



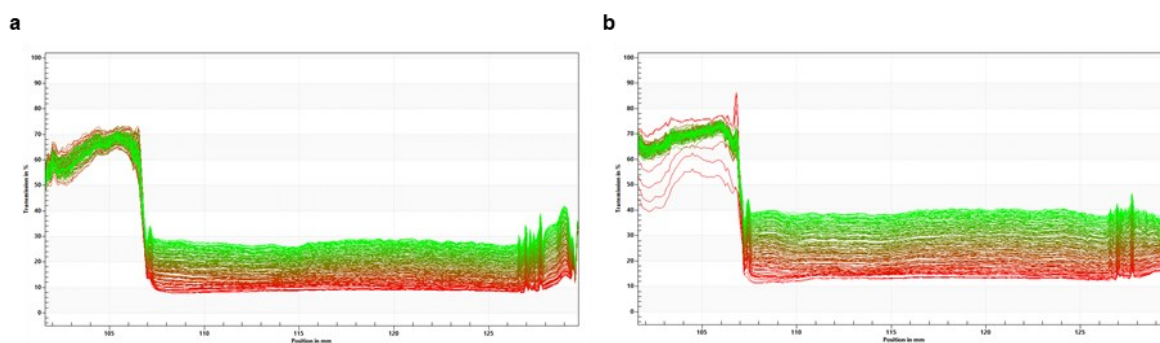
Fonte: Autora (2021).

Figura B.5 - Perfis de transmissão de triplicatas da dispersão **05-C/βCF** com índices de separação 0,05 (a), 0,01 (b) e 0,02 (c).



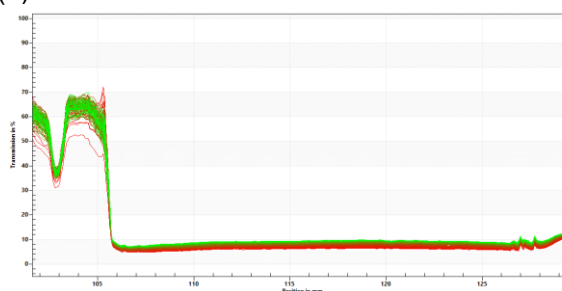
Fonte: Autora (2021).

Figura B.6 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **06-OC** com índices de separação 0,23 (a) e 0,34 (b).



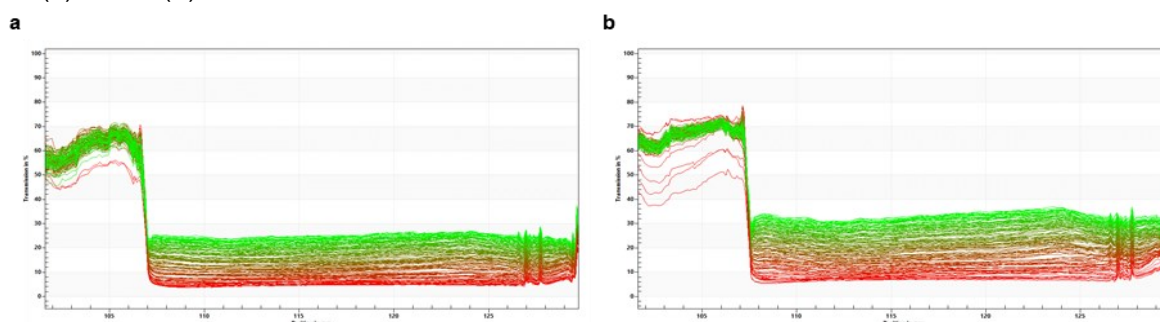
Fonte: Autora (2021).

Figura B.7 - Perfis de transmissão de triplicatas da dispersão **07-OC/βCF** com índices de separação 0,035 (a), 0,14 (b) e 0,14 (c).



Fonte: Autora (2021).

Figura B.8 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **08-OC/βCF** com índices de separação 0,24 (a) e 0,31 (b).



Fonte: Autora (2021).

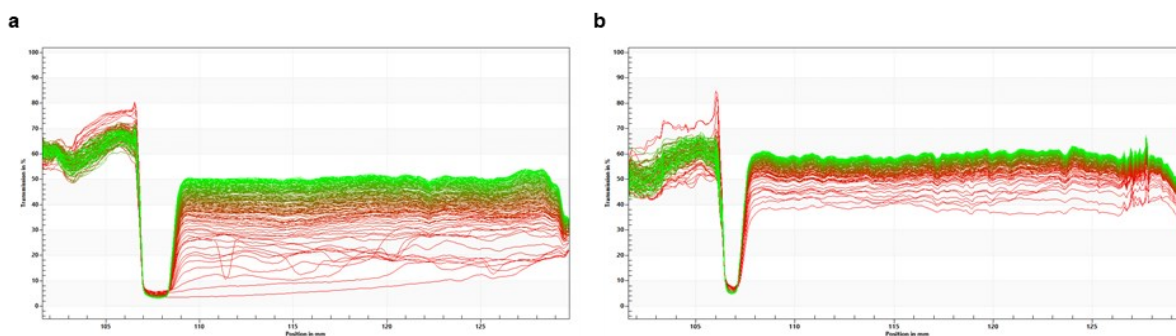
Tabela B.2 – Composição e índice de separação das dispersões com BPCL. Ensaio realizado por LUMIsizer® (4000 rpm e 1,04 h) das dispersões com teor de sólidos de 0,2%_m.

	09 – βCF	10 – βCF	11 – C	12 – C/βCF	13 – C/βCF	14 – OC	15 – OC/ βCF	16 – OC/ βCF
β-Cariofileno	100% ^a	50% ^a		50% ^a	80% ^a		50% ^a	80% ^a
Crodamol			100% ^a	50% ^a	20% ^a			
Óleo de Copaíba						100% ^a	50% ^a	20% ^a
Índice de Separação^b	0,46 ± 0,09	0,51 ± 0,05	0,11	0,01 ± 0,004	0,10 ± 0,05	0,17 ± 0,006	0,15 ± 0,03	0,38 ± 0,02

^a Porcentagem mássica em relação ao polímero, (%_{ativo/APCL}) e ^b valor médio de duplicata.

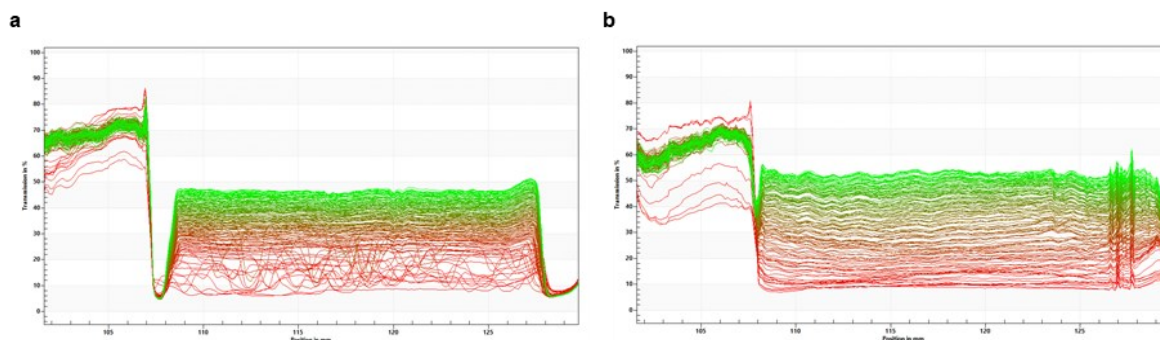
Fonte: Autora (2021).

Figura B.9 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **09- β CF** com índices de separação 0,52 (a) e 0,40 (b).



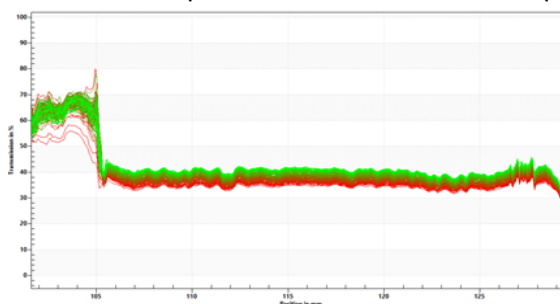
Fonte: Autora (2021).

Figura B.10 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **10- β CF** com índices de separação 0,47 (a) e 0,54 (b).



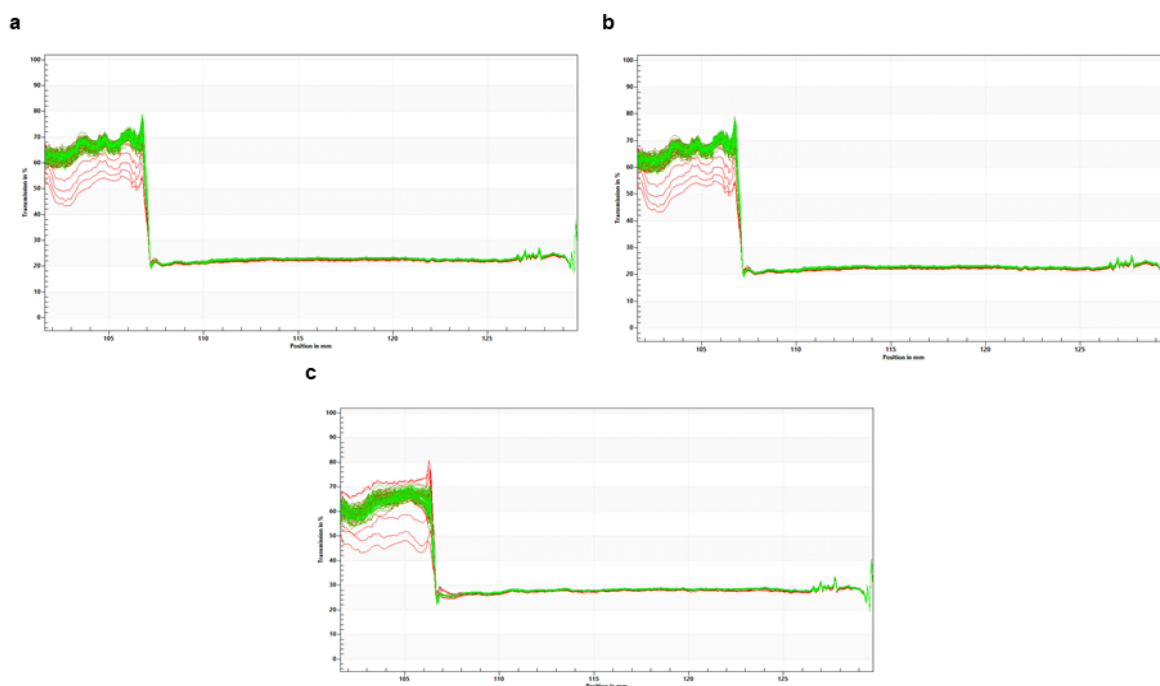
Fonte: Autora (2021).

Figura B.11 - Perfis de transmissão da dispersão **11-C** com índice de separação 0,11.



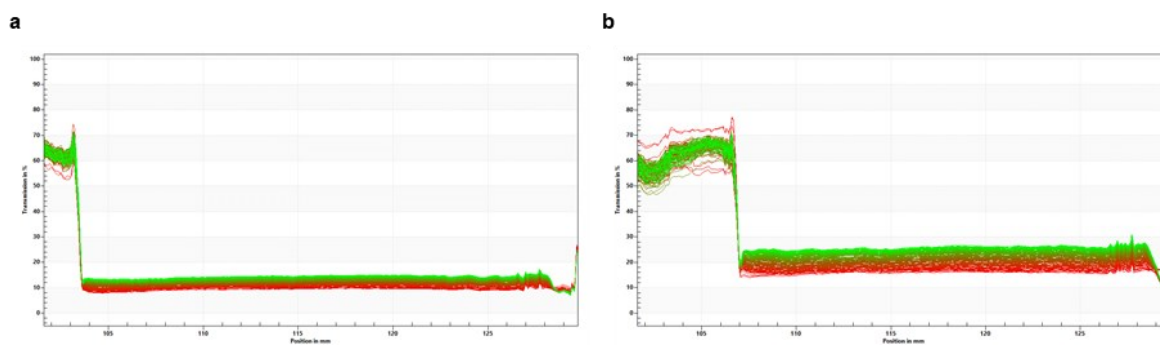
Fonte: Autora (2021).

Figura B.12 - Perfis de transmissão de triplicatas da dispersão **12-C/ β CF** com índices de separação 0,009 (a), 0,014 (b) e 0,014 (c).



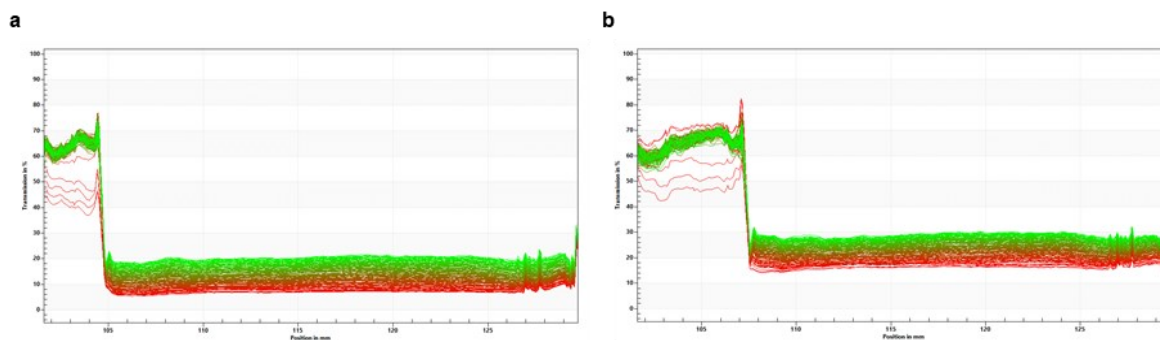
Fonte: Autora (2021).

Figura B.13 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **13-C/βCF** com índices de separação 0,06 (a) e 0,13 (b).



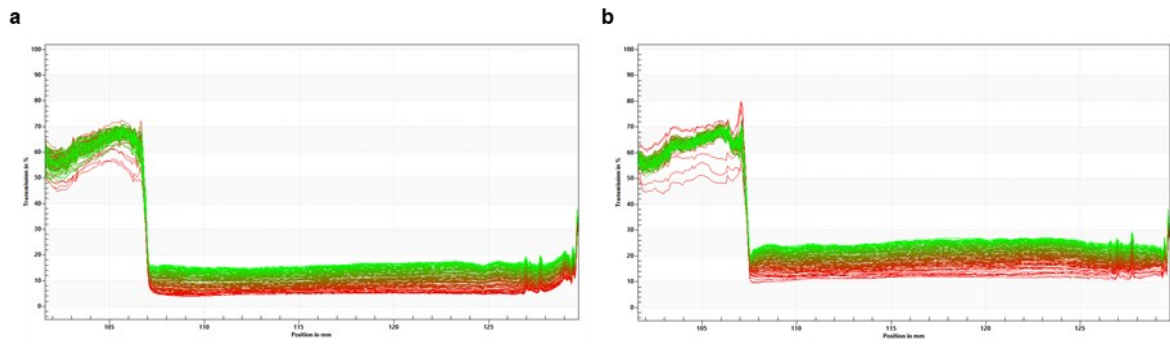
Fonte: Autora (2021).

Figura B.14 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **14-OC** com índices de separação 0,16 (a) e 0,17 (b).



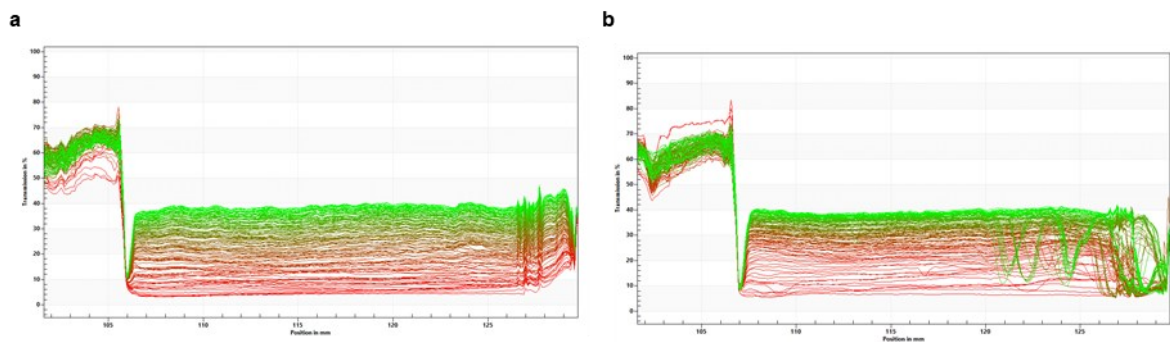
Fonte: Autora (2021).

Figura B.15 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **15-OC/βCF** com índices de separação 0,13 (a) e 0,17 (b).



Fonte: Autora (2021).

Figura B.16 - Perfis de transmissão de duplicatas da dispersão **16-OC/βCF** com índices de separação 0,40 (a) e 0,37 (b).

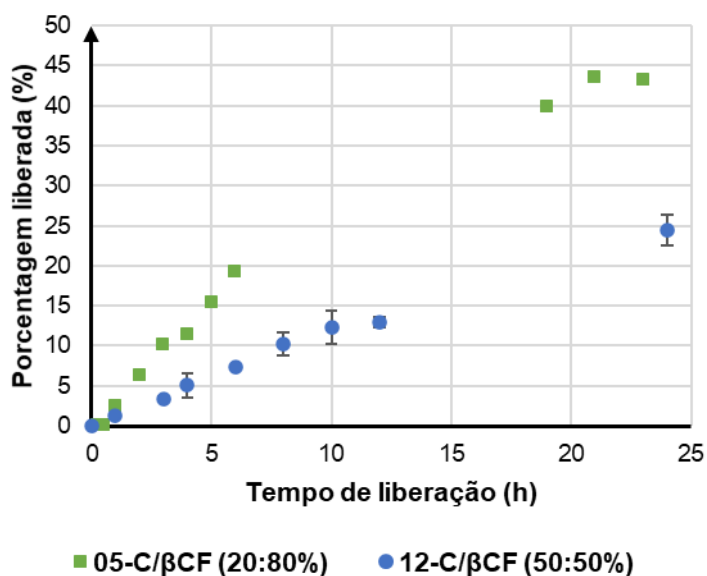


Fonte: Autora (2021).

APÊNDICE C – Liberação

O gráfico da Figura 30, representa o perfil de liberação das nanopartículas **05-C/βCF** e **12-C/βCF**, com APCL e BPCL, respectivamente. A análise completa dos dados não foi concluída, tendo os resultados de apenas 24 h, de um total de 10 dias de ensaio, sendo em triplicata, apenas a **12-C/βCF**. No entanto, já foi possível identificar uma maior liberação da dispersão **05-C/βCF**, equivalente a 43,3%, enquanto a **12-C/βCF**, liberou $24,5 \pm 1,9\%$ da massa inicial relativa ao βCF.

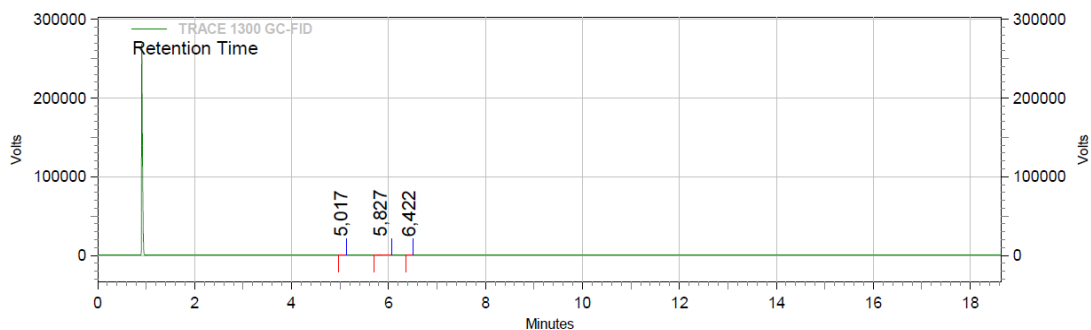
Figura 31 - Ensaio de liberação de βCF para a nanopartícula **05-C/βCF** (verde) do polímero de maior massa molar (APCL) e **12-C/βCF** (azul) do polímero de menor massa molar (BPCL).



Fonte: Autora (2021)

ANEXO A - Composição β -Cariofileno

Figura 32 - Cromatograma β -Cariofileno.



Fonte: Autora (2021).

Tabela 11 - Composição β -cariofileno

Constituinte	TR	Concentração (%)
NI	5,017	1,46
Cariofileno	5,827	93,03
α -humuleno	6,422	5,50

Fonte: Autora (2021).

ANEXO B - Composição óleo de copaíba

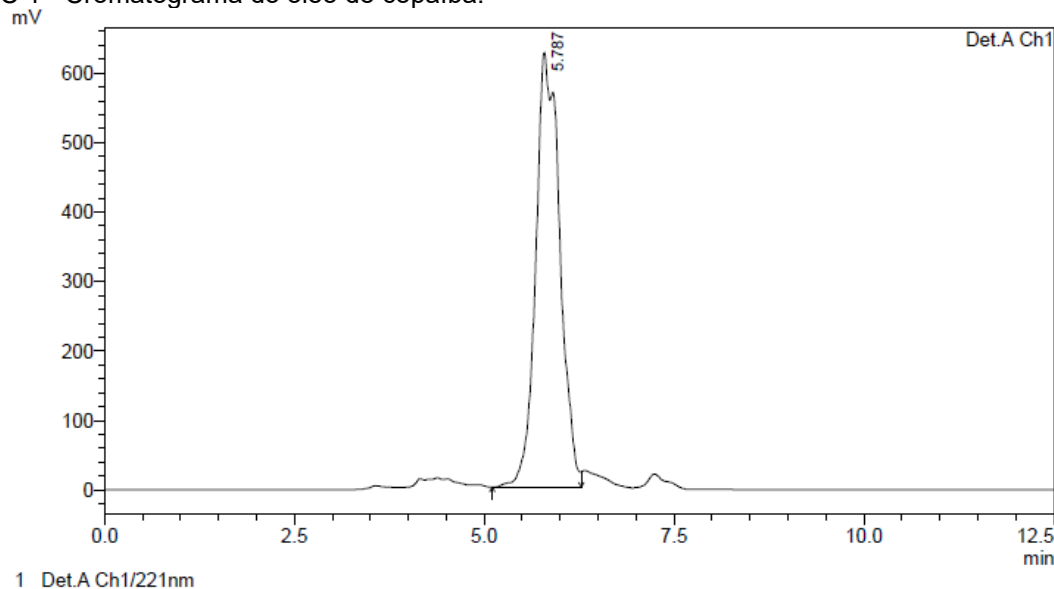
Tabela 12 - Composição do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne

	Constituintes	IR	Teor (%)
1.	NI	1214	-
2.	δ - elemeno	1335	1,19
3.	α - cubebeno	1348	0,56
4.	α - copaeno	1374	6,25
5.	β - elemeno	1389	3,12
6.	α - gurjuneno	1409	0,32
7.	(β) - cariofileno	1417	33,59
8.	γ - elemeno	1434	1,98
9.	NI	1445	0,65
10.	NI	1454	0,30
11.	α - humuleno	1471	4,76
12.	<i>allo</i> - aromadendreno	1481	0,58
13.	γ - muuroleno	1497	2,96
14.	germacreno D	1503	10,66
15.	β - selineno	1506	0,56
16.	γ - amorfeno	1510	0,63
17.	α - muuroleno	1515	2,23
18.	δ - amorfeno	1520	0,34
19.	γ - cadineno	1524	1,05
20.	δ - cadineno	1530	4,60
21.	α - cadineno	1541	1,16
22.	selina - 3,7(11) - dieno	1548	0,47
23.	germacreno B	1558	2,89
24.	Cariofilenol	1565	2,19
25.	Eudesma - 4(14) - en-6 α -ol	1606	2,01
26.	NI	1621	0,50
27.	Torreiol	1625	0,97
28.	α - muurolol	1629	0,84
29.	α - cadinol	1637	1,61
30.	Selina - 11-en-4- α -ol	1676	1,71
31.	Éster metílico do ácido copálico	-	2,64
32.	NI	-	0,28
33.	Éster dimetílico do ácido agático	-	0,36
34.	Éster metílico do ácido 11-hidróxi-copálico	-	0,52
35.	Éster dimetílico do ácido 11-acetoxi-copálico	-	1,63
36.	NI	-	0,56
Constituintes Identificados:		94,35%	
Constituintes NÃO Identificados:		5,64%	

Fonte: Valdir Veiga (2020).

ANEXO C - Cromatograma óleo de copaíba

Figura C 1 - Cromatograma do óleo de copaíba.



PeakTable

Detector A Ch1 221nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.787	13836456	625246	100.000	100.000
Total		13836456	625246	100.000	100.000

Fonte: Autora (2021)

Tabela C 1 - Solução de óleo de copaíba avaliada e resultado obtido por análise de HPCL.

OC (mg)	ACN (g)	C _{OC, Teórica} (mg.g ⁻¹)	Área cromatograma	C _{βCF} ^a (mg.g ⁻¹)	Porcentagem ^a
13,3	10,07	1,32	13836456	0,8757	66,31%

^a Referente a área do cromatograma correspondente ao βCF.

Fonte: Autora (2021)

A metodologia adotada neste trabalho para quantificar o teor de βCF, por análise de HPLC, não foi específica para quantificar o OC. Desse modo, no mesmo pico do cromatograma referente ao βCF, mais compostos do óleo foram identificados. O óleo de copaíba possui uma concentração de 34% de βCF (Anexo B), e foi obtida a concentração 66% através da metodologia e curva padrão adotadas para quantificar o teor de βCF. As considerações e correções utilizadas para quantificar a eficiência de encapsulação das nanopartículas contendo OC, estão descritas no item 3.2.9.2.