



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANDERSON DE SOUZA MORAES

**CARACTERIZAÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOCÁPSULAS DE TIMOL E
AVALIAÇÃO DA PERMEÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE REPELENTE
CONTRA *Aedes aegypti***

FORTALEZA

2015

ANDERSON DE SOUZA MORAES

CARACTERIZAÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOCÁPSULAS DE TIMOL E
AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE REPELENTE
CONTRA *Aedes aegypti*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Co-orientador: Dr. Diogo dos Santos Miron

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M818c Moraes, Anderson de Souza.
Caracterização farmacêutica de nanocápsulas de timol e avaliação da permeação cutânea e da atividade repelente contra *Aedes aegypti*/ Anderson de Souza Moraes. – Fortaleza, 2015.
90 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
- Coorientação: Diogo dos Santos Miron.
1. Timol. 2. Aedes. 3. Nanocápsulas. 4. Repelentes de Insetos. I. Título.

CDD 615.1

ANDERSON DE SOUZA MORAES

CARACTERIZAÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOCÁPSULAS DE TIMOL E
AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE REPELENTE
CONTRA *Aedes aegypti*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Co-orientador: Dr. Diogo Miron dos Santos

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a.. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Antonia Torres Ávila Pimenta (Suplente)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Maura e Antenor, por sempre priorizar a educação dos filhos.

Às minhas irmãs, Roberta e Renata, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e coragem necessária para seguir com minhas atividades.

Aos meus pais, Antenor e Maura, pelo amor, carinho e pelos investimentos em meus estudos que, muitas vezes, exigiu sacrifícios para eles. Muito obrigado!

Às minhas irmãs, Roberta e Renata, pelo apoio incondicional aos meus estudos.

À Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, pela orientação e incentivo na pesquisa, pelo exemplo de determinação, dedicação e competência em tudo que faz.

Agradeço aos que participaram diretamente para realização desse trabalho, em especial ao Dr. Diogo Miron, por toda a dedicação, o desempenho e compartilhamento de bons momentos de discussão que fizeram esse trabalho evoluir.

À Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho pelo apoio e aos seus colaboradores do Laboratório de Bioprospecção, Davi Farias, Pedro Mateus e Nayana Soares.

À Professora Palmira Remião da UNESP, Araraquara, por ter me recebido e proporcionado a oportunidade de aumentar o conhecimento e enriquecer o trabalho.

A todos do CEFAC pelo companheirismo e momentos de descontração nas horas estressantes.

Agradeço à Elizama e Gabrieli pela amizade, pela ajuda e pelos conselhos.

Ao Rhoden, meu primo-irmão que sempre se fez presente na minha vida.

Agradeço, em especial, aos meus grandes amigos, Thiala, Camila, João Paulo, Egberto pela presença constante e pelo apoio em momentos difíceis

Aos meus amigos Emanuel, Diego, Mariana, Pedro, Liziane, Victor, João Victor, Bia, Vérica e Jani e todos os outros que nunca me abandonam nos momentos de descontração.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo no desenvolvimento da pesquisa nacional.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"As pessoas têm medo das mudanças. Eu
tenho medo que as coisas nunca mudem."
(Chico Buarque de Hollanda)

RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa que pode se manifestar de forma grave, com quadros hemorrágicos. O agente etiológico é um *arbovirus* transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da doença. As principais medidas de combate são controle do mosquito e proteção individual, que pode dar-se com o uso de repelentes. Quase a totalidade dos repelentes no mercado possui DEET como ativo, que possui restrições de uso. Neste sentido, o timol (monoterpeno) tem-se mostrado promissor como repelente de inseto (*Ae. aegypti*), sendo a agregação de tecnologias essencial para a viabilidade de um produto repelente à base de timol. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi a preparação e caracterização farmacêutica de nanocápsulas de timol, com avaliação da permeação cutânea, citotoxicidade e atividade repelente de inseto (*Ae. aegypti*). Para tanto, foi desenvolvido e validado método analítico para identificação e quantificação do timol por CLAE-DAD nas nanocápsulas de timol (NCT – 1%), que apresentou um teor de ativo em torno de 85%. Prosseguindo a caracterização das NCT, foram determinados o diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulação e pH, além do estudo de estabilidade. Análises das NCT mostraram um diâmetro médio de aproximadamente 150 nm, PZ negativo ($-27,83 \pm 2,60$), PDI abaixo de 0,2 e uma eficiência de encapsulação de 98 %. NCT e solução etanólica de timol foram avaliadas quanto à liberação, permeação e retenção de timol através de membrana de diálise ou da pele de orelha suína, em um modelo de células de difusão de Franz. A NCT mostrou controle da liberação de timol em relação à solução etanólica de timol, que apresentou por sua vez uma liberação máxima de 53,8% da dose em 24 horas de ensaio, superior à quantidade liberada pela NCT (17,6%), evidenciando a diminuição da permeabilidade do timol quando nanoencapsulado. Análise da citotoxicidade do timol livre e encapsulado (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em queratinócitos humano através do teste de MTT, mostrou a citotoxicidade do timol livre - 100 $\mu\text{g/mL}$ (% células viáveis: $16,1 \pm 3,2$), que foi praticamente destituída com a encapsulação deste (% células viáveis: $92,7 \pm 31$). Avaliação preliminar do potencial repelente das NCT ao mosquito *Ae. aegypti* em humano mostrou que a administração tópica desse produto promoveu até 67 % de repelência. Os resultados obtidos sugerem que as NCT padronizadas possuem características morfológicas e químicas de interesse para um nanossistema, além do potencial repelente ao mosquito *Ae. aegypti*.

Palavras chaves: timol, *Aedes aegypti*, nanocápsula, atividade repelente, citotoxicidade

ABSTRACT

Dengue is an infectious disease that may also happen in a severe form with hemorrhagic events. The etiological agent of the disease is an arbovirus which is transmitted by the mosquito *Aedes aegypti*, the primary vector of the disease. The main actions to combat the disease are mosquito control and personal protection that can take place using repellents. Almost all repellents have DEET as active substance, which has use restrictions. In this context, thymol (monoterpene) has become a potential insect repellent against *Ae. aegypti*, and the use of technologies is essential to the viability of a repellent thymol based product. Given the above, the aim of this study was the preparation and pharmaceutical characterization of thymol nanocapsules and evaluation of skin permeation, *in vitro* cytotoxicity and mosquito repellence (*Ae. aegypti*). For this purpose, we developed and validated analytical method for identification and quantification of thymol by HPLC-PDA. Nanocapsules thymol (NCT - 1%) showed an active content of 85%. Continuing the characterization, NCT were analyzed for the mean diameter (D), polydispersity index (PDI), potential zeta (PZ), encapsulation efficiency, pH and product stability. Results shared showed an average diameter of approximately 150 nm, negative PZ ($-27,83 \pm 2,60$), PDI less than 0.2 and an encapsulation efficiency of 98%. NCT and ethanolic solution of thymol were evaluated for release, permeation and retention of thymol through dialysis membrane or the porcine ear skin in a Franz diffusion cell model. NCT showed release control of thymol in relation to the ethanolic solution of thymol, which showed a maximal release of 53.8% of the dose within 24 hours of testing, higher than the amount released by the NCT (17.6%) indicating the decrease in permeability when nanoencapsulated. Cytotoxicity analysis of free and encapsulated thymol (50 to 100 ug / ml) in human keratinocytes by MTT assay showed cytotoxicity of free thymol - 100 ug / mL (% viable cells: 16.1 ± 3.2), which was virtually devoid with this encapsulation (% viable cells: 92.7 ± 31). Preliminary assessment of the repellent potential of NCT against *Ae. aegypti* showed that in human topical administration of the product promoted up to 67% repellency. The results suggest that standardized NCT has morphological and chemical characteristics of interest to a nanosystem, plus the potential repellent against *Ae. aegypti* mosquito

Keyword: Thymol, *Aedes aegypti*, nanocapsules, Permeation, repellent activity, cytotoxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição global de ocorrência de dengue.....	18
Figura 2 - Exemplos de terpenos e produtos naturais relacionados (a); Estrutura molecular do timol (b).....	24
Figura 3 - Esquema ilustrativo da estrutura da pele.	26
Figura 4 - Os mecanismos de transporte através da pele. intercelular (a), transcelular (b) e via folículos piloso (c).....	27
Figura 5 - Desenho esquemático de uma célula de Franz.	29
Figura 6 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.	31
Figura 7 - Cromatogramas em 276 nm da Nanocápsula Branca (a) e Nanocápsula de Timol (b).	49
Figura 8 - Gráfico da pureza de pico do timol em amostra contendo fármaco+NC branca.	50
Figura 9 - Curva de calibração do timol por CLAE-DAD com detecção em 276 nm e respectiva equação da reta e coeficiente de determinação obtidos por regressão linear.	51
Figura 10 - Gráfico dos resíduos do ensaio de linearidade do timol por CLAE-DAD com detecção em 276 nm.	52
Figura 11 - Gráfico de Diâmetro e PDI das NCT.....	59
Figura 12 - Fluxo em função do tempo para liberação do timol em solução e em NC através de membrana de diálise.	67
Figura 13 - Ajuste do modelo moexponencial aos resultados da liberação do timol através de membrana de acetato de celulose.	70
Figura 14 - Cromatogramas (CLAE-DAD) em 218 nm. (a) Extrato da pele de orelha de porco na ausência (a) e na presença do timol (b).....	72
Figura 15 - Avaliação da toxicidade do timol livre e encapsulado em queratinócitos (linhagem HaCat) através do teste do MTT.....	76
Figura 16 - da avaliação do potencial repelente das NCT em humano.	77

LITSTA DE TABELAS

Tabela 1 - Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.	35
Tabela 2 - Fase móvel.....	36
Tabela 3 - Desenho experimental de Plackett-Burman empregado na avaliação da robustez do método analítico para análise do timol por CLAE - DAD.	39
Tabela 4 - Fatores de diluição utilizados para os meios testados	41
Tabela 5 - Composição quali-quantitativa da NCT	42
Tabela 6 - Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico (CLAE-DAD) para quantificação do timol na NCT.	53
Tabela 7 - Avaliação da precisão do método (CLAE-DAD) para dererminação do teor do timol na NCT (276 nm).	54
Tabela 8 - Avaliação da exatidão do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol na NCT.	55
Tabela 9 - Fatores e níveis estudados no ensaio de robustez do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol em timol em NC.	56
Tabela 10 - Avaliação da robustez do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol em timol em NC.	57
Tabela 11 - Medida de diâmetro de partícula, PDI e potencial zeta da NCT no estudo de estabilidade no tempo zero.	59
Tabela 12 - Teor de timol das nanocápsulas	60
Tabela 13 - Eficiência de encapsulação para formulação de nanocápsulas de timol.	60
Tabela 14 - Relação de diâmetro e volume de partícula com o cut-off dos filtros utilizados na eficiência de encapsulação.....	62
Tabela 15 - Estudo de estabilidade da NCT: caracterização quanto ao diâmetro (D), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), teor e pH.	64
Tabela 16 - Solubilidade da timol a 32 °C em diferentes meios de dissolução.....	65
Tabela 17 - Difusão para ensaio de liberação de timol através de membrana de diálise.	66

Tabela 18 - Valores do coeficiente de permeabilidade no estudo da liberação das formulações de timol.....	68
Tabela 19 - Resultados da análise da cinética de liberação do timol pelos modelos mono e biexponencial.....	69
Tabela 20 - Resultados da modelagem da liberação da solução de timol e timol NC através de membrana de acetato de celulose.	70
Tabela 21 - Avaliação da recuperação do timol em extrato da pele de orelha de porco.	73
Tabela 22 - Quantidade de timol permeado na pele de orelha de porco determinada com auxílio da célula de Franz.....	74
Tabela 23 - Avaliação da retenção cutânea do timol em pele de orelha de porco determinado por CLAE-DAD.	74
Tabela 24 - Avaliação do potencial repelente das NCT em humano.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Type Culture Collection
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BV	Balão volumetrico
CLAE-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo e
DAD	Diodo
D	Diâmetro
DEET	N,N-dietil-3-metilbenzamida
DMEM	Dubelco`s Medium Eagle Modified
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EPM	Erro padrão da média
FHD	Forma Grave da Dengue
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
ISO	International Standard Organization
MSC	Critério de Seleção de Modelo
MTT	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCB	Nanocápsula Branca
NCs	Nanocápsulas
NCT	Nanocápsulas de Timol
NCTr1	Nanocápsula de Timol - réplica 1
NCTr2	Nanocápsula de Timol - réplica 2
OELS	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Padrão analítico
PDI	Índice de polidispersão
PE	Percentual de encapsulamento
PLGA	Poly(Lactide-co-Glycolide)
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato

PZ	Potencial zeta
RE	Resolução Específica
SEP	Solução Estoque Padrão
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
Tx	Triton X – 100
USP	TheUnited States Pharmacopeia
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

SUMÁRIO	15
1.INTRODUÇÃO	17
1.1Dengue.....	17
1.2Controle da dengue	19
1.3Terpenos como fonte de repelentes de insetos: Timol.....	22
1.4Pele e modelos experimentais de permeação cutânea	25
1.5Nanotecnologia e liberação controlada de fármacos.....	30
1.6Estudo de liberação	31
2.JUSTIFICATIVA.....	32
3.OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4.MATERIAIS.....	34
5.MÉTODOS	36
5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico	36
5.1.1 <i>Especificidade</i>	36
5.1.2 <i>Linearidade e intervalo</i>	37
5.1.3 <i>Limites de Detecção e de Quantificação</i>	37
5.1.4 <i>Precisão</i>	38
5.1.5 <i>Exatidão</i>	38
5.1.6 <i>Robustez</i>	38
5.2 Solubilidade.....	41
5.3 Preparação das nanocápsulas de timol	41
5.4 Caracterização e estudo de estabilidade da NCT	42
5.4.1 <i>Avaliação macroscópica</i>	42
5.4.2 <i>Avaliação do pH</i>	42
5.4.3 <i>Avaliação do Tamanho e índice de polidispersão da NCT</i>	42
5.4.4 <i>Potencial zeta</i>	43
5.4.5 <i>Eficiência de Encapsulação</i>	43

	16
5.5	Estabilidade 44
5.6	Perfil de liberação em células de Franz..... 44
5.7	Permeação e retenção do timol em pele de orelha de porco com auxílio de células de Franz.. 44
5.7.1	<i>Validação da extração de timol da pele</i> 45
5.8	Avaliação de citotoxicidade em queratinócitos 46
5.9	Avaliação do potencial repelente das NCT ao mosquito <i>Ae. aegypti</i> em humano 46
5.10	Análise estatística 47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO48
6.1	Desenvolvimento e validação de método analítico..... 48
6.1.1	<i>Especificidade</i> 48
6.1.2	<i>Linearidade</i> 50
6.1.3	<i>Limites de Detecção e de Quantificação</i> 52
6.1.4	<i>Precisão</i> 53
6.1.5	<i>Robustez</i> 56
6.2	Preparação e caracterização de nanocápsulas de timol (NCT)..... 57
6.3	Estudo da estabilidade das NCT 62
6.4	Solubilidade 65
6.5	Liberação 66
6.6	Permeação e retenção cutânea do timol livre e encapsulado <i>in vitro</i> 73
6.7	Avaliação da Citotoxicidade do timol livre e encapsulado em queratinócitos 75
6.8	Avaliação do potencial repelente das NCT ao mosquito <i>Ae. aegypti</i> em humano 76
7.	CONCLUSÕES78
8.	REFERÊNCIAS79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

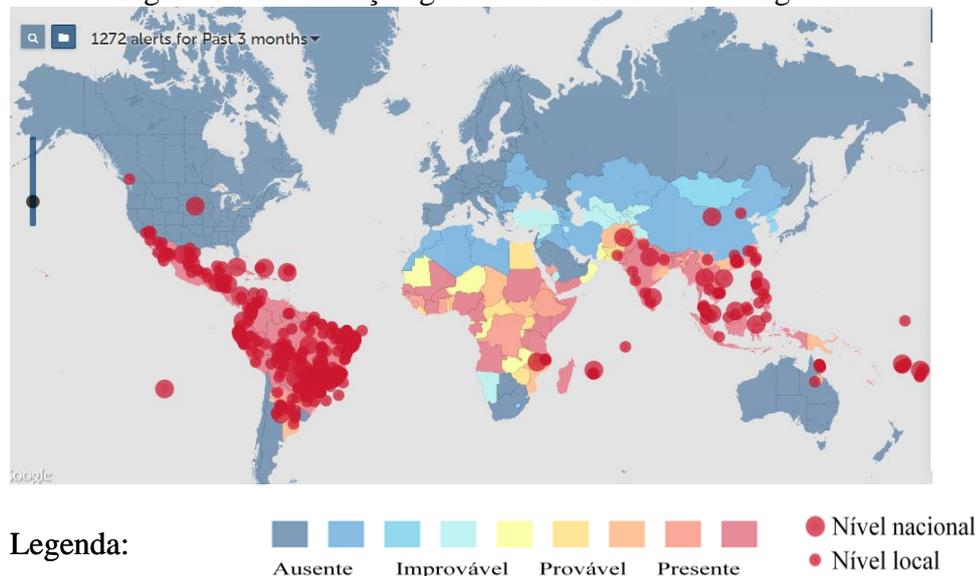
A dengue é uma doença infecciosa, febril aguda. Tal doença pode ainda se manifestar mais severamente, denominada Forma Grave da doença, com quadro clínico que apresenta febre alta, fenômenos hemorrágicos, muitas vezes com hepatomegalia e, em casos extremos, sinais de insuficiência circulatória. Pacientes acometidos pela dengue hemorrágica podem desenvolver choque hipovolêmico, resultante do extravasamento de plasma, denominado síndrome do choque associado à dengue, que muitas vezes pode levar à morte do paciente (WHO, 1997; GUBLER, 1998).

O agente etiológico da doença é um vírus oriundo dos artrópodes, o "arthropod-bornvírus ou arbovírus". Este vírus possui quatro sorotipos geneticamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae (que inclui o vírus da febre amarela). A infecção por um sorotipo de dengue confere imunidade por toda a vida para este vírus, porém não existe imunidade cruzada que proteja o indivíduo para os outros sorotipos. Assim, as pessoas que vivem em regiões endêmicas podem ser infectadas com três a possivelmente quatro sorotipos de dengue durante a sua vida e com isso há um aumento na probabilidade de contrair a forma grave da doença de acordo com a hipótese da infecção secundária (GUBLER, 1998).

A hipótese da infecção secundária assume que os pacientes que sofrem uma segunda infecção com um vírus da dengue sorotipo heterólogo possuem um risco significativamente maior de desenvolver dengue hemorrágica e síndrome do choque, quando um anticorpo preexistente reconhece e forma um complexo de antígeno-anticorpo com o vírus heterólogo que é internalizado nos leucócitos, principalmente macrófagos, porém o vírus não é neutralizado e consegue se replicar livremente no interior do macrófago. Sugere-se que estas células produzam e secretem mediadores vasoativos em resposta à infecção por dengue, o que causa um aumento da permeabilidade vascular, com hipovolemia e choque. Outra hipótese que é levada em conta como causa da dengue hemorrágica parte do princípio de que os vírus da dengue, como todos os vírus de animais, variam e se modificam geneticamente como resultado das pressões de seleção durante a replicação em humanos e / ou mosquitos e que há algumas linhagens de vírus que tenham um maior potencial epidêmico. Essas variações podem incluir o aumento da gravidade da doença (virulência) e, conseqüentemente, apresentarem sintomas mais graves (GUBLER, 1998) .

Devido aos tipos mais graves da doença, a dengue se tornou um alvo de grande preocupação para a Organização Mundial de Saúde (OMS) e para órgãos de saúde de vários países do mundo, incluindo o Brasil. A dengue é uma virose de grande importância epidemiológica mundial (Figura 1). Estima-se que três bilhões de pessoas encontram-se em áreas de risco para contrair dengue no mundo e que, anualmente, ocorram 50 a 100 milhões de infecções, com 500.000 casos da Forma Grave da Dengue (FHD) e 22.000 óbitos, principalmente em crianças. Os países tropicais (onde temperatura e umidade favorecem a proliferação do mosquito) são os que apresentam maior incidência. Entre as doenças re-emergentes, é a que se constitui como mais grave problema de saúde pública (CDC, 2015; WHO, 2015).

Figura 1 - Distribuição global de ocorrência de dengue



Fonte: WHO, 2015.

No Brasil, durante o primeiro trimestre de 2015, foram registrados 460.502 casos de dengue. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados, 66,1% em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste, 13%; Nordeste, 11,1%; Sul, 5,6% e Norte, 4,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Tais dados confirmam a dengue como um grave problema de saúde pública.

A transmissão da doença ocorre através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Aedes aegypti* ou *Ae. albopictus*, sendo no Brasil conhecida apenas a ocorrência do primeiro (CÂMARA *et al.*, 2007). Dentre os possíveis ciclos de transmissão, o mais importante, do ponto de vista da saúde pública, é o ciclo endêmico que ocorre em centros

urbanos de regiões tropicais, como no Brasil, que consiste na transmissão *Ae. aegypti* - *Homo sapiens* - *Ae. aegypti*, com epidemias periódicas. Em cidades muito endêmicas, certamente há a coexistência de vários sorotipos do vírus, o que agrava a situação, aumentando a probabilidade da forma grave (VIEIRA, 2006; WHO, 2009a).

O *Ae. aegypti*, é um inseto pertencente à FAMÍLIA Culicidae, SUBFAMILIA Culicinae, GÊNERO *Aedes* (NEVES & SILVA, 1989; REY, 1992). Esta espécie de mosquitos é classificada como antropofílica por se alimentar de sangue humano preferencialmente. Além desta característica, o *Ae. aegypti* possui hábitos domésticos, o que aumenta a capacidade vetorial da espécie. Neste sentido o *Ae. aegypti* é uma espécie extremamente adaptada ao convívio humano, o que determina sua grande eficiência na transmissão do vírus da dengue (DEKKER, GEIER, CARDÉ, 2005).

1.2 Controle da dengue

Medidas de controle coletivo da dengue são efetuadas pelas autoridades sanitárias de diversos países, a mais eficaz seria eliminar a população do mosquito *Ae. aegypti*, principal vetor da doença, interrompendo o ciclo de reprodução do mosquito (CDC, 2015). Neste sentido, campanhas de conscientização são realizadas para evitar acúmulo de água que servem como foco para a deposição de ovos. Houve diminuição considerável na incidência da doença após a descoberta do efeito inseticida do DDT, no período da Segunda Guerra mundial, e posteriormente outros grupos de inseticidas, como os organofosforados, carbamatos e mais recentemente os piretróides, introduzidos no mercado por possuírem menor custos e menor persistência no ambiente e cadeia alimentar (SUAREZ & VERBEL, 2013). Essa diminuição foi efetiva apenas em países mais desenvolvidos, não havendo a erradicação desejada nos países menos desenvolvidos por questões de infra estrutura. Dessa maneira, se fez necessária a busca de outras alternativas para o controle da doença, focando na diminuição da incidência e em maneiras de reduzir a gravidade e letalidade (TAUIL, 2002).

Outra forma seria pela utilização de uma vacina tetravalente eficaz, ou seja, é necessária proteção contra todos os sorotipos simultaneamente (Mc ARTHUR & EDEMAN, 2015). De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, no final de 2012 três vacinas já estavam sendo testadas pelos testes pré-clínicos e clínicos. Uma das vacinas está sendo desenvolvida pela empresa Sanofi utilizando DNA recombinante, em 2012 já deu início aos testes em humanos com previsão de produção da vacina para 2015, porém dados apontam que não foi explicitamente relatada a tetravalência da vacina, onde não mais de 18 -

26% dos indivíduos testados apresentaram soroconversão tetravalente após a primeira dose. Outra vacina está sendo elaborada pela Bio-Manguinhos com a parceria da GSK® (GlaxoSmithKline), utilizando vírus mortos. Também pode-se citar a vacina desenvolvida pelo Instituto Butantan, com vírus geneticamente modificado. Porém, os resultados até então obtidos ainda não permitem definir com certeza quando vacinas eficazes e seguras estarão disponíveis contra a dengue. Estima-se que até 2016 uma vacina estará disponível no mercado. Em relação a medicamentos específicos para tratamento da dengue, existe uma lacuna, restando, assim, como alternativa mais eficaz as medidas de combate ao vetor da doença (FIOCRUZ, 2015).

Os seres humanos são alvo de muitas espécies de insetos que se alimentam através de picadas. Através dos tempos, as pessoas têm usado uma variedade de técnicas para se proteger contra essas picadas e consequentes infecções relacionadas a esses animais. Entre estas técnicas estão incluídos o uso de barreiras físicas, tais como vestuário, telas e redes; o uso de repelentes químicos na pele e substâncias tóxicas em redes, roupas e outros tipos de tecido, além de evitar áreas infestadas com pragas ou vetores de doenças (WHO, 2000).

Na atualidade, a tecnologia mais utilizada com a finalidade de proteção pessoal tem sido focada em repelentes químicos. A este respeito, muitos produtos têm sido desenvolvidos. Chou e colaboradores (1997) definem repelente como uma substância química natural ou sintética, na forma de vapor, que seja capaz de inibir a busca ao hospedeiro pelo inseto, fazendo com que o mesmo necessite deixar, ou não se aproximar da pele ou superfície tratada, ou ainda sair da zona de concentração do vapor repelente.

Medidas de redução do impacto das picadas de insetos têm sido importantes no esforço mundial de saúde pública para proteger com segurança os pacientes e evitar a propagação de doenças transmitidas por artrópodes, tais como malária, febre amarela, dengue, entre outras, além de servir para diminuir a gravidade das reações alérgicas a picadas de muitos mosquitos. Nesse contexto, o repelente é uma ferramenta importante para a proteção individual, principalmente em regiões endêmicas onde o risco de se contrair doença é alto (BROWN & HEBERT, 1997; KATZ, MILLER, HEBERT, 2008). Tendo em vista que uma única picada por mosquito infectado pode resultar em transmissão de doença, é importante escolher um repelente que seja eficaz e, preferentemente, possua efeito duradouro (FRADIN & DAY, 2002).

Substâncias utilizadas como repelentes com a finalidade de aplicação na pele devem possuir algumas características essenciais listadas a seguir.

- ✓ Não ser tóxico para seres humanos;

- ✓ Não apresentar irritabilidade cutânea;
- ✓ Apresentar atividade contra uma ampla gama de insetos que se alimentem de sangue;
- ✓ Proteção contra picadas por várias horas, independentemente da pressão de picada do artrópode (relacionada com a quantidade de aproximações, pousos e picadas efetivas);
- ✓ Custo;
- ✓ Aceitabilidade do usuário;
- ✓ Possuir odor agradável e/ou ser inodoro;
- ✓ Não causar danos às vestimentas.

Repelentes são classificados como produtos cosméticos de Grau 2 que, de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (BRASIL, 2005). Comercialmente, os repelentes de insetos podem ser divididos em três classes de substâncias: as de origem sintética, os derivados de produtos naturais, e os que associam substâncias sintéticas e naturais (TUETUN *et al.*, 2005).

O DEET - N,N-dietil-3-metilbenzamida é considerado o repelente de mais amplo espectro e tem sido largamente utilizado desde os anos 1950, hoje estima-se que seja utilizado por 30% da população dos EUA. O DEET está disponível em concentrações que variam de 5 a 40%, sendo as concentrações mais utilizadas entre 10 e 35%, estas capazes de proporcionar proteção adequada. Além disso, as mais altas concentrações estão relacionadas a uma maior duração da repelência. O DEET pode causar efeitos tóxicos, principalmente em crianças e gestantes. Estudos relatam casos de encefalopatias relacionados ao uso de DEET, principalmente em crianças (THAVARA *et al.*, 2001). As reações adversas ocasionadas pelo uso tópico de DEET incluem: irritação dérmica, urticária e dermatite de contato, geralmente relacionadas às altas doses aplicadas em extensa área corpórea. Em relação a sua absorção pela pele, o DEET apresenta lipossolubilidade que favorece a absorção, o que não é desejado para esse tipo de produto. (FRADIN, 1998; FRADIN & DAY, 2002). A ANVISA restringe o uso de produtos com DEET a crianças acima de 2 anos de idade. Além disso, para a faixa etária de 2 a 12 anos, o número máximo de reaplicações de produtos contendo DEET deve ser 3 vezes ao dia, sendo que a concentração do ativo não deve exceder 10% (BRASIL, 2006). Em relação às vestimentas, relata-se que o DEET é seguro para utilização em roupas de

algodão, lã, náilon, porém é capaz de danificar materiais como couro pigmentado, plástico (armações de óculos) e vinil (certos bancos de automóveis).

Dentre as classes de moléculas derivadas de produtos naturais empregadas como repelentes, destacam-se as que são obtidas a partir dos óleos essenciais, tais como o óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS) que apresenta em sua composição compostos voláteis, tais como carvacrol, p-cimeno, timol, α -felandreno (monoterpenos) e β -cariofileno, α -copaeno, α -humuleno (sesquiterpenos). O timol constitui-se o composto majoritário no OELS, podendo seu teor variar de 34,2 a 95,1% (COSTA, 2002). O referido óleo essencial foi estudado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprospecção da UFC, coordenado pela Profa Dra Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho. Estudos anteriores realizados pelo referido grupo avaliaram produtos como vela e loção à base do OELS. A vela apresentou eficácia de proteção de aproximadamente 60% enquanto a loção mostrou eficácia de cerca de 90% em modelo animal (SENA, 2006). Além desses estudos, formulações à base de timol e OELS em macroemulsão foram testadas em humanos, apresentando eficácia de repelência sem diferenças significativas quando comparadas a formulações comerciais à base de DEET (MORAES, 2011). Os compostos que constituem os óleos essenciais são majoritariamente os terpenos e são conhecidos por conferir as atividades biológicas descritas para os óleos essenciais. Esses compostos podem ser obtidos por fontes naturais ou até mesmo de forma sintética (TAWATSIN *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2006).

1.3 Terpenos como fonte de repelentes de insetos: Timol

Terpenos são hidretos de carbono de fórmula geral $(C_5H_8)_n$ constituídos por múltiplos da molécula fundamental do isopreno (2-metilbutadieno), (DAMBOLENA *et al.*, 2008), sendo conhecidos aproximadamente vinte mil compostos isolados de fontes naturais (DO AMARAL, 1995; NES; ZHOU, 2001; ROBBERTS *et al.*, 1996).

Os terpenos sofrem ainda uma subdivisão que os diferencia entre terpenos verdadeiros e terpenóides. Os primeiros se apresentam como hidrocarbonetos saturados e são formados por adição de moléculas de isopreno. Já os terpenóides possuem menor ou maior teor de hidrogênio do que os terpenos verdadeiros, pois os grupos metila são rearranjados, removidos ou são adicionados átomos de oxigênio, porém conservam em sua estrutura unidades isoprênicas e podem ser encontrados na forma linear ou cíclica. Uma denominação mais genérica foi criada a fim de classificar os compostos terpenóides baseada no número de átomos de carbonos na molécula, tendo-se os monoterpenos (C10 - possuem dez carbonos em

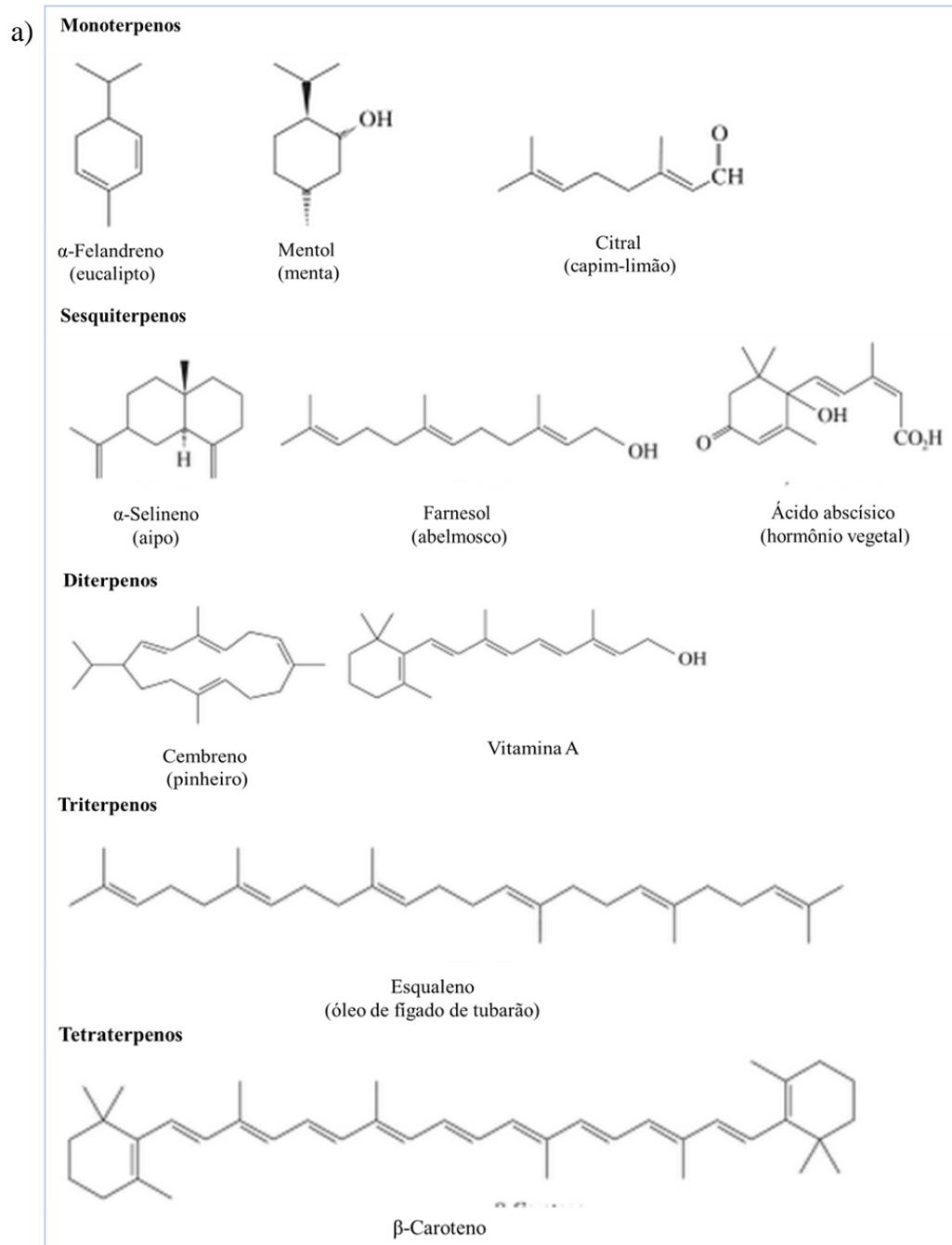
sua estrutura), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (Figura 2), dentre estes, os monoterpenos e sesquiterpenos são os compostos mais frequentemente encontrados (SIMÕES, 2001; BAKKALI *et al.* 2008).

Monoterpenos, participam na composição de 90% dos óleos essenciais em plantas aromáticas e estão relacionados com uma série de funções químicas, tais como alcoóis, aldeídos, éteres, entre outras (VODA *et al.*, 2003; SEO *et al.* 2008). Em relação ao potencial farmacológico, existe uma grande quantidade descrita como, por exemplo, aplicações como agentes antimicrobianos (ZYGADLO & JULIANI, 2000), além de muitos estudos realizados a partir de produtos derivados de plantas contendo monoterpenos terem comprovadamente uma variedade de atividades farmacológicas, como atividade antiinflamatória, antinociceptiva, sedativa, anticonvulsivante, gastroprotetora antissecretória e hepatoprotetora (SANTOS & RAO, 2000; TOSCAN, 2010). Exemplos largamente conhecidos de monoterpenos com atividade farmacológica comprovada são o timol e carvacrol, compostos que têm demonstrado possuir uma atividade inibitória em bactérias (DIDRY *et al.*, 1994; ULTEE *et al.*, 1998) e fungos (CHAO, YOUNG, OBERG, 2000).

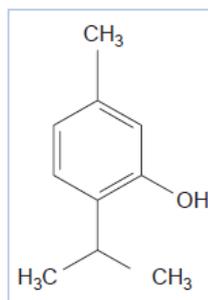
L. sidoides constitui uma das espécies que possui uso difundido no nordeste brasileiro (LORENZI, MATOS, 2002), pertencendo à relação de plantas medicinais do Programa Farmácias Vivas, bem como compõe a RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS. Esta planta aromática possui óleo essencial rico em timol, (LEAL *et al.*, 2003). O OELS possui propriedades farmacológicas já determinadas, tais como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, bactericida, fungicida e larvicida e parte desses efeitos são relacionados à presença do timol (CAVALCANTI *et al.*, 2004; KUNLE *et al.*, 2003; GIRÃO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2003; BOTELHO, 2007).

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpeno que apresenta-se na forma de pó branco cristalino e possui odor ligeiramente picante. Trata-se de um derivado de fenol alquilado (Figura 2) de grande utilização na indústria, agricultura, em cosméticos e alimentos (SZENTANDRÁSSY *et al.*, 2003).

Figura 2 - Exemplos de terpenos e produtos naturais relacionados (a); Estrutura molecular do timol (b).



b)



Fonte: CAREY, 2008; DAMBOLENA, 2008.

Além das propriedades largamente estudadas, o timol possui atividade larvicida e repelente já descritas. Estudos mostraram que o óleo essencial de *Trachyspermum ammi* (Linn.), rico em timol, apresenta atividade larvicida. A partir desse resultado, Pandey e colaboradores (2009) compararam atividade larvicida e repelente desse óleo essencial e de timol isolado contra o vetor da malária, o mosquito *Anopheles stephensi*. Os autores obtiveram resultados onde o timol apresentou atividade larvicida superior ao óleo essencial, com valores de DL_{50} de 48,88 e 80,77 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O timol apresentou ainda repelência completa para adultos de *A. stephensi* na dose de 25,0 mg distribuída em uma área de 22×35 mm após 1 h de duração, enquanto que mesmo grau de repelência foi obtido pelo óleo na dose de 55,0 mg, indicando assim um importante papel do composto nas atividades biológicas do óleo essencial. Atividade larvicida foi demonstrada também nos estudos de Carvalho e colaboradores (2003) e o OELS, rico em timol, como mencionado anteriormente, e seu hidrolato tiveram ação larvicida contra *Ae. aegypti* ($n=20$) provocando mortalidade quase instantânea (de 1 a 5 minutos). O timol, composto majoritário do OELS, mostrou também ação larvicida de 100% a uma concentração de 0,085% p/v.

1.4 Pele e modelos experimentais de permeação cutânea

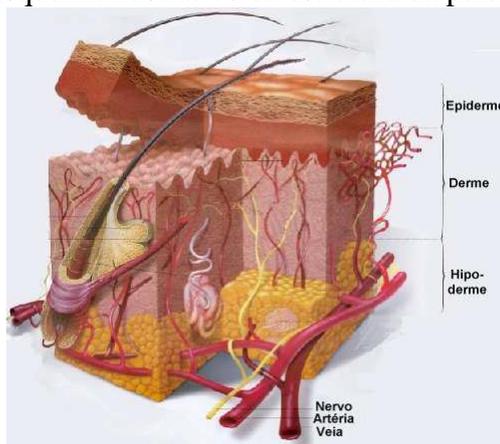
A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, representando um total de 5% do peso de um indivíduo. Em uma pessoa adulta de estatura e peso medianos, a superfície da pele pode chegar a 2 m² de área e 4,2 kg, e ainda recebe cerca de 30% da circulação sanguínea. Sua principal função é a proteção da pessoa, por exemplo, contra a perda de substâncias endógenas, ou ameaças do ambiente como temperaturas extremas, substâncias tóxicas, radiação ultravioleta (UV), umidade e regulação da pressão sanguínea (BARRY, 1983; AULTON, 2005; WILLIAMS & BARRY, 2012).

Existe uma subdivisão do órgão, em três camadas diferentes: epiderme, derme e hipoderme (Figura 3). A epiderme constitui a camada mais externa e é formada por tecido epitelial especializado, dividido em várias camadas sendo a mais externa, o estrato córneo, responsável pela função de barreira da pele, devido à sua lipofilicidade e elevada ligação entre as células. O estrato córneo é composto por corneócitos queratinizados incorporados em camadas duplas lipídicas e possui na parte extracelular predominantemente lipídica, ceramidas, colesterol e ácidos graxos.

A derme é a camada mais próxima da hipoderme, é composta por colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e fibroblastos. Constitui-se uma camada altamente

vascularizada, e nela estão os chamado apêndices da pele, receptores e nervos especializados, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos, além de leucócitos, adipócitos e mastócitos. Já a hipoderme, protege o corpo contra baixas temperaturas, trata-se de um tecido conjuntivo com células adiposas que conecta a derme e a fáscia muscular (JUNQUEIRA *et al.*, 1995).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da estrutura da pele.



Fonte: LAMOREA. Transporte através da pele, 2006. Ilustração. *apud* SILVA, 2013

A pele tem sido usada como via para aplicação de medicamentos e cosméticos por muito tempo, e tem havido muitos avanços referentes ao processo de penetração ou retenção de substâncias (HADGRAFT *et al*, 2005). A produção da ação biológica em sítios específicos pode necessitar que haja acúmulo da substância ativa, do produto ou fármaco desde a superfície da pele, mais precisamente no estrato córneo, até a epiderme viável ou parte superior da derme, sendo para tanto, requerida a penetração do fármaco na pele por difusão ou absorção percutânea (ALLEN *et al*, 2007).

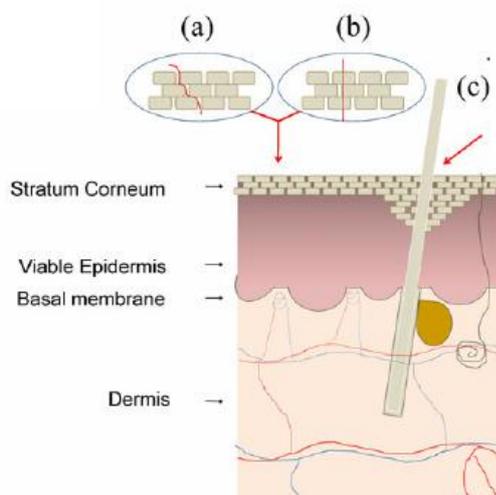
Existem três vias passivas, ilustradas na Figura 4, através da qual uma molécula pode atravessar o estrato córneo, são elas (CONTRI *et al.*, 2011):

- ✓ Intercelular: Por meio de solubilização em lípidos extracelulares dispostos em bicamadas;
- ✓ Transcelular: Através dos corneócitos e as bicamadas lipídicas;
- ✓ Via apêndices: Através da glândulas sudoríparas ou folículos pilosos.

Neste sentido, o estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e os movimentos de entrada e saída de substâncias químicas da pele. Devido à sua natureza densa, os valores dos coeficientes de difusão neste tecido são muito reduzidos, o que resulta em grande resistência e impermeabilidade geral (CONTRI *et al.*, 2011). Tal característica deve

ser levada em conta no desenvolvimento de uma formulação, para que a mesma possua constituintes que favoreçam o efeito desejado.

Figura 4 - Os mecanismos de transporte através da pele. intercelular (a), transcelular (b) e via folículos piloso (c).



Fonte: CONTRI *et al.*, 2011.

Na administração de medicamentos ou cosméticos pela via cutânea, é necessário que haja acúmulo de substância ativa na pele, seja o produto de ação sistêmica ou ação tópica. Assim, o conhecimento sobre o fluxo de fármacos através da pele é imprescindível e testes de permeação cutânea tornam-se necessários (OECD, 2004).

Para estudos de permeação e retenção cutânea, métodos *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizados. Os ensaios *in vivo*, em animais, são tradicionalmente aplicados para a avaliação da absorção da pele para fins regulatórios, tais ensaios possuem como vantagens a geração de informação cinética sistêmica e metabólica. Em contrapartida, algumas limitações dificultam a execução desse tipo de ensaio, tais como a utilização de animais vivos; a necessidade de material marcado radioativamente para facilitar resultados confiáveis; fenômeno de reabsorção, onde o sistema microcirculatório podem transportar compostos da derme para dentro do compartimento central; além das diferenças na permeabilidade das espécies normalmente utilizadas, por exemplo rato, e da pele humana (OECD, 2004; SCCP, 2006).

Métodos *in vitro* têm sido executados e descritos em um considerável número de trabalhos. Sua principal limitação em relação aos *in vivo* seria o fato de não ser possível reproduzir integralmente as condições de reabsorção da substância em estudo pelo fluxo sanguíneo periférico, não podendo assim ser plenamente estudado em tal configuração. Por outro lado, os ensaios *in vitro* realizados por uma metodologia bem fundamentada poderão

produzir resultados bastante coerentes em comparação aos *in vivo*. (FRANZ, 1975; SCCP, 2006).

Uma das vantagens dos ensaios *in vitro* é que o tecido dérmico pode manter a permeação de compostos que, *in vivo*, seriam reabsorvidos no compartimento sistêmico, o que possibilita uma quantificação mais precisa. Além disso, o modelo *in vitro* tem larga utilização como ferramenta de triagem ou para comparação qualitativa do potencial de permeação cutânea entre produtos químicos, entre espécies e entre veículos, desde que testados em condições idênticas (FRANZ, 1975; SANCO, 2004). Por outro lado, pode ser utilizada igualmente a pele de seres humanos, de animais ou até mesmo artificiais (FLATEN, 2015). Tal alternativa evita questões éticas, geradas quando há utilização de animais vivos e permite um estudo mais aprofundado de possíveis danos das substâncias à pele (OECD, 2004; SCCP, 2006). Outra vantagem é a possibilidade de administrar as condições do estudo, especialmente a temperatura, e de serem estudos facilmente realizáveis e menos dispendiosos (DE ANTONIO, 2007).

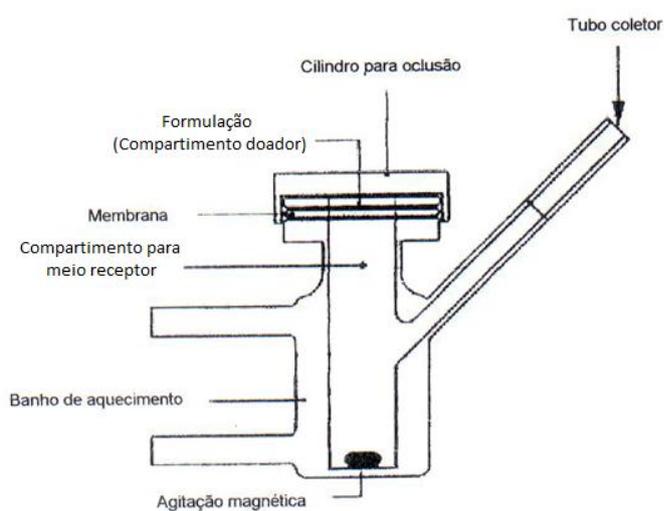
Os estudos *in vitro* utilizam pele de várias espécies de mamíferos, como seres humanos, rato e porco. Estudos *in vitro* utilizando pele humana são considerados padrão ouro para o monitoramento de permeação da droga e avaliação das formulações, e podem proporcionar uma boa representação dos processos *in vivo* (FRANZ, 1975). Porém, existe pouca disponibilidade desse tipo de pele, que normalmente são obtidas de sobras de cirurgia plástica. Há também necessidade de submissão ao Comitê de Ética e a dificuldade e custos de armazenagem tornam o seu uso limitado (RIGG, BARRY, 1990; BABY *et al.*, 2008). A pele de ratos sem pelo também é considerada uma alternativa, porém possui permeabilidade consideravelmente superior à pele humana, devido à alta densidade de folículos pilosos da epiderme mais delgada, dificultando assim a comparação de resultados obtidos (VAN DE SANDT *et al.*, 2000).

Já a pele de porco tem grande utilização por conta de sua semelhança com a pele humana, em termos de morfologia, fisiologia, histologia, bioquímica, densidade pilosa e as suas características de permeabilidade, tornando uma alternativa prática (DIEMBECK, 1999; OECD 2004; BARBERO & FRASCH, 2009). São encontrados trabalhos na literatura científica os quais comparam os resultados de permeação de pele humana, rato e porco. Schomook e colaboradores (2001), por exemplo, concluíram que a pele de porco seria a mais apropriada na substituição da pele humana em experimentos *in vitro*, resultado semelhante foi reportado por Van de Sandt (2000) que encontrou que a permeabilidade da pele ao pesticida

Propoxur em pele não viável de orelha de porco gerava resultados semelhantes aos obtidos com a pele humana.

O ensaio de permeação *in vitro* é geralmente realizado com o auxílio de células de difusão, o tipo mais comum denomina-se células de Franz. Basicamente, a célula de difusão é constituída de uma parte superior denominada compartimento doador e uma parte inferior, compartimento receptor, separados pela membrana, como pode ser observado na Figura 5 que ilustra o modelo de célula de Franz utilizada atualmente. É importante que as condições termodinâmicas, principalmente a temperatura do meio receptor, sejam controladas durante todo o experimento e a superfície da pele na célula de difusão deve ser mantidas a $32 \pm 1^\circ \text{C}$, simulando temperatura normal da pele (OECD, 2004).

Figura 5 - Desenho esquemático de uma célula de Franz.



Fonte: FONSECA, 2007.

O meio receptor aceito para avaliar compostos solúveis em água são geralmente soluções salinas com o pH 7,4. No caso de substâncias lipofílicas do fluido receptor pode conter solventes orgânicos, tais como etanol: água 1:1 ou polietileno glicol de até 6% em água. O meio receptor presente nas células de difusão deve permanecer sob agitação em toda a duração do experimento (SCCP, 2006; OECD, 2004). O meio doador deve manter a membrana exposta a uma constante concentração da substância a ser permeada, e a fase receptora cujas amostras são coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco.

1.5 Nanotecnologia e liberação controlada de fármacos

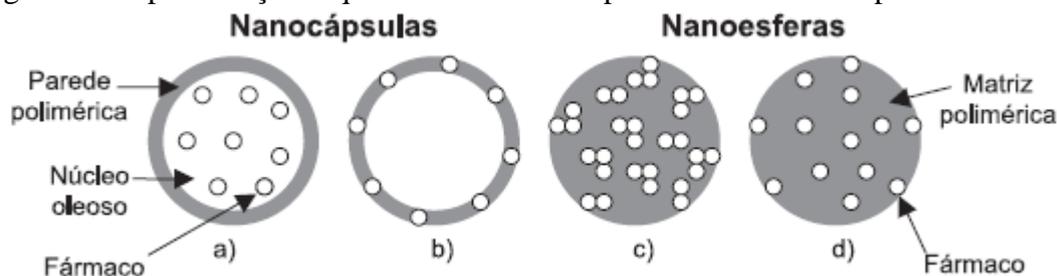
O timol, componente majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, possui fácil evaporação por ser um monoterpeneo (VODA *et al.*, 2003; SEO *et al.* 2008). Para a utilização deste composto em um produto repelente com efeito duradouro e constante, é interessante que a formulação propicie o controle da liberação desse ativo para o meio. Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido utilizada como uma ferramenta para obtenção de resultados melhores quanto à estabilidade e aumento do potencial da terapêutico (SCHAFFAZICK, 2003).

Ao longo das últimas décadas tem havido um interesse considerável no desenvolvimento da nanotecnologia, principalmente após o avanço da microscopia eletrônica na década de 80, com a chegada dos microscópios de varredura por sonda (KEIPER, 2003). A biotecnologia tem lançado mão da crescente nanotecnologia para o desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis como dispositivos de administração de medicamentos mais eficazes. O objetivo maior da concepção dessas partículas é obter a liberação controlada de agentes farmacologicamente ativos para o sítio de ação específico, a uma taxa de dose e regime terapêutico ideal (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

As nanopartículas são definidas como partículas sólidas, podendo ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. O fármaco pode estar encapsulado ou fisicamente e uniformemente disperso em uma matriz, e a obtenção de uma ou outra forma pode depender da metodologia de preparo empregada (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Uma das características fundamentais das nanopartículas é o seu tamanho, geralmente considerado como tendo tamanho mínimo de cerca de 5-10 nm até no máximo 1000 nm, aproximadamente, contudo o tamanho das nanopartículas obtidas apresenta-se geralmente entre 100 e 500 nm (QUINTANAR *et al.*, 1998).

Nanoesferas são formadas por matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Já as nanocápsulas podem ser comparadas a sistemas vesiculares, onde uma substância é armazenada em uma cavidade que consiste em um núcleo líquido oleoso, rodeado por uma camada de polímero (Figura 6). A cavidade pode conter a substância ativa sob a forma líquida ou sólida ou como uma dispersão molecular (FESSI. H. *et al.*, 1989; DEVISSAGUET *et al.*, 1991; MORA-HUERTAS, C. *et al.*, 2010). Além disso, nanocápsulas podem também levar a substância ativas adsorvidas em sua superfície ou aderidas à parede polimérica (KHOEE & YAGHOBIAN, 2008). Uma das vantagens das nanocápsulas sobre as nanoesferas é o baixo conteúdo polimérico e a elevada capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos, como o timol, devido ao núcleo oleoso interno (BLOUZA *et al.*, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003. Legenda: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

1.6 Estudo de liberação

No desenvolvimento de uma formulação para liberação tópica de fármacos, muitos fatores devem ser considerados, como a estabilidade do fármaco, o uso específico do produto e o sítio de aplicação. O potencial de liberação do fármaco do veículo é dependente das propriedades físico-químicas do fármaco e dos componentes químicos da matriz que foram combinados para preparar a formulação (SMITH, MALBACH e SURBER, 2000).

O estudo de liberação é realizado com membrana sintética, que funciona como barreira de difusão passiva. O ensaio tem a utilidade de promover a verificação da quantidade de substância em estudo que é liberada da matriz (formulação) dado um período de tempo e sob condições a serem definidos pelo tipo de formulação a ser testada (PAGLIARA *et al.*, 1999). Trata-se de um importante ensaio para a avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produto (SCCP, 2006; MACCARI, 2011).

Este teste tem sido utilizado por vários autores para auxiliar na caracterização e até mesmo na escolha de formulações durante a fase de desenvolvimento de produtos. Maccari (2011) realizou o ensaio de liberação com membrana sintética de acetato de celulose para a comparação de duas formulações contendo o terpeno terpinen-4-ol. O fluxo obtido para uma das formulações foi de 14,62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ enquanto que para a outra foi de 6,703 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, demonstrando que o terpinen-4-ol é mais facilmente liberado em uma das formulações, concluindo-se que os constituintes da formulação e/ou a metodologia de preparação interferem nas características do ativo e possivelmente no seu efeito.

2. JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença infecciosa, febril aguda que pode se manifestar de forma grave, com quadros hemorrágicos (WHO, 1997). Devido a grande incidência (50 a 100 milhões de casos de dengue por ano no mundo) e a mortalidade, a dengue se tornou um alvo de grande preocupação para a Organização Mundial de Saúde (OMS). Medidas de controle coletivo da dengue são efetuadas pelas autoridades sanitárias de diversos países e a mais eficaz seria eliminar a população do mosquito *Ae. aegypti*, principal vetor da doença (CDC, 2015). A aplicação de inseticida como o DDT mostrou-se uma ferramenta de controle da doença útil para as autoridades sanitárias, porém a erradicação parece algo de difícil alcance, restando como alternativa maneiras de reduzir a taxa de mortalidade e minimização dos sintomas nas pessoas acometidas pela doença além de viabilizar a proteção individual com fins de prevenção (TAUIL, 1998). Produtos repelentes são uma alternativa para o controle da dengue, porém os produtos comerciais, como o DEET, possuem limitações quanto a irritabilidade, uso infantil e baixo período de ação (CHOU et. al., 1997).

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpene volátil e apresentou atividade repelente contra o mosquito vetor da dengue – *Ae. aegypti* (Sena, 2006). Tendo em vista que os terpenos são compostos de fácil evaporação (VODA et al., 2003; SEO et al. 2008) é interessante que haja controle da liberação desse ativo para o meio a fim de garantir o efeito de repelência mais duradouro e constante. Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido utilizada como uma ferramenta para obtenção de resultados melhores quanto a estabilidade e controle da liberação com aumento da potencialidade dos ativos (SCHAFFAZICK, 2003).

Diante do exposto, é oportuno investir no desenvolvimento de um produto à base de timol a ser utilizado como repelente, empregando nanotecnologia para o controle da liberação, prolongamento da ação do ativo, aumento da estabilidade e redução da toxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar a nanocápsula de timol (NCT) e avaliar a estabilidade, a liberação, permeação cutânea, citotoxicidade e atividade repelente contra *Ae. aegypti* em humano.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para a quantificação do timol nanoencapsulado;
- Caracterizar as NCT quanto ao teor de ativo (CLAE-DAD), eficiência de encapsulação, pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a estabilidade físico-química da formulação de nanocápsula;
- Determinar o perfil de liberação do timol livre e encapsulado, bem como o grau de permeação e retenção cutânea *in vitro* em pelo de porco;
- Avaliar a citotoxicidade do timol livre e encapsulado em queratinócitos humanos através do teste do MTT;
- Investigar o potencial repelente contra *Ae. aegypti* das NCT em humano.

4. MATERIAIS

4.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi submetido ao Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, sob o protocolo é 5054 PIBITI 2014/2015 - Edital 01/14 Universidade Federal do Ceará/Propesq

4.2 Queratinócitos humano

A linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) foi adquirida na American Type Culture Collection (ATCC) através do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.3 Animais

Colônias do mosquito *Ae. aegypti* e fêmeas separadas após o estágio de pupa. As fêmeas dos mosquito pertencentes à linhagem Rockefeller foram obtidas do Núcleo de Controle de Vetores - NUVET - Ceará.

A membrana utilizada no teste de permeação e retenção cutânea foi retirada da pele da orelha de porco, não escaldada, adquirida do Frigorífico após o abate rotineiro de animais para o consumo, por isso não havendo necessidade de aprovação pelo comitê de ética.

4.4 Drogas, reagentes e padrões de trabalho

O Timol, molécula de estudo, foi adquirido puro da empresa Sigma-Aldrich® (EUA), 99,5% de pureza. Os adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizados no desenvolvimento da pesquisa estão listados na Tabela 1 com respectivo fornecedor. A água foi purificada por uma sequência de destilação (Destilador Tecnal®, TE 178, Brasil) e deionização (Deionizador Permutation®, Brasil).

4.5 Equipamentos

O aparelho utilizado para a quantificação do timol foi o cromatógrafo Waters (Milford USA) modelo Alliance 2695 com detector de arranjo de foto diodos (DAD) modelo 2696. No preparo e caracterização das nanocápsulas poliméricas foram utilizados os seguintes equipamentos: banho-maria (modelo ALB 250C, ALBRAS[®], Brasil); rotaevaporador (modelo R-3, Buchi[®], Brasil); deionizador (modelo simplicity 185, MILLIPORE[®], Brasil); Zetasizer Nano- ZS (Malvern Instruments, UK); Pipetas automáticas (Gilson[®], França); agitador magnético (modelo Mag-multi, Marte[®], Brasil), balança (modelo HR200, A&D, Japão) e phmetro (modelo HI 221, HANNA instruments, Brasil). Na avaliação farmacológica foi usada estufa (modelo ECB Linea, Olidef cz[®], Brasil).

Tabela 1 - Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.

Adjuvantes farmacêuticos e reagentes	Fornecedor
Acetona (PA)	Dinâmica [®] , Brasil
Acetonitrila (HPLC)	J.T.Baker, EUA
DMSO (dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Etanol (PA)	Vetec, Brasil
Fosfatidilcolina	Lipid [®] , Brasil
Metanol (HPLC)	Tédia; JT Baker, EUA
Metanol (PA)	Vetec, Brasil
MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio)	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Miglyol [®]	DEG [®] , Brasil
PLGA Poly(Lactide-co-Glycolide)	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Pluronic F-127 (Poloxamer)	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Triton X-100	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Twen 80	Sigma-Aldrich [®] , EUA

5. MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico

As análises foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE sob as seguintes condições: fluxo 1,2 mL/min, fase móvel (Tabela 2) acetonitrila: ácido acético 0,05%, pH 4,00 (60:40, v/v), volume de injeção 20 µL, detecção em 276 nm, forno a 32 °C, pré coluna e coluna Waters C18 XBD (250x4,6 mm, 5 µm).

A validação do método foi realizada conforme preconizado na Resolução Específica (RE) 899/03 "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" – categoria I da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2003). Nesse sentido, foram determinados os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

Tabela 2 - Fase móvel.

Fase	Composição	Quantidade	% na Fase móvel
Aquosa	Ácido acético glacial	5 mL	40
	Água MilliQ q.s.p	1,0 L	
Orgânica	Acetonitrila	Grau HPLC	60

5.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi testada através da avaliação da influência das nanocápsulas (NC), objeto de estudo desse trabalho a ser descrita posteriormente, na análise do timol por CLAE-DAD. Para tanto, foram preparadas soluções timol e timol+NC branca, conforme descrito a seguir:

Solução de Nanocápsula Branca (NCB): foi preparada transferindo-se 200 µL de NC branca para BV 10 mL. Adicionaram-se 6 mL de acetonitrila e agitou-se para completa dissolução das NC. O volume foi completado com água.

Solução padrão: preparou-se (Solução Estoque Padrão de timol – SEP) de 3 mg/mL, posteriormente foram transferidos 500 µL da SEP para Balão Volumétrico (BV) 10 mL e o volume completado com acetonitrila 60%, obtendo uma solução padrão de 150 µg/mL.

Solução padrão + Nanocápsula Branca: preparou-se transferindo-se 200 µL de NC branca para BV 10 mL com 6 mL de acetonitrila para completa dissolução das NC e adicionados 500 µL da SEP e volume foi completado com água.

Foi realizada a determinação da pureza de pico com auxílio do programa Empower 2[®] empregando para análise faixa de comprimento de onda entre 210 e 300 nm e "threshold" calculado com ruído (calculado entre 0.25-0.75 min) mais a influência do solvente (ajustado como 1°).

5.1.2 Linearidade e intervalo

A linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para realização do ensaio de linearidade, 50 mg de timol padrão foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL com 40 mL de etanol 75% para completa solubilização do analito e o volume completado com água para obtenção da Solução Estoque (SE) a 1,0 mg/mL. A SE foi utilizada para obtenção de oito soluções mais diluídas com concentrações de 1,8; 5; 18; 40; 90; 180; 270 e 350 µg/mL, contemplando o intervalo de 1,2 – 233% (considerando 150 µg/mL de timol como 100%). As soluções foram preparadas em duplicata, sendo realizadas duas corridas em cada amostra. A linearidade da média das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas pela concentração de timol foi estimada pelo método dos mínimos quadrados. Também foi realizada a análise de resíduos dos resultados obtidos para as concentrações citadas.

5.1.3 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através de parâmetros da regressão linear conforme descrito pelas equações 1 e 2. Quatro concentrações mais baixas da curva de calibração foram utilizadas para estimativa do desvio padrão do intercepto e inclinação da curva: 1,8; 5; 18 e 40 µg/mL.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2014).

5.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada através do cálculo do DPR (Desvio padrão relativo) de seis determinações da formulação de nanocápsulas contendo timol (NCT). As soluções foram preparadas transferindo-se 200 μ L das NCT para balão volumétrico de 10 mL, tendo uma concentração teórica aproximada de 150 μ g/mL. A precisão foi avaliada pela repetibilidade do resultado das seis determinações da amostra de NCT realizada por dois analistas em dias diferentes e pela precisão intermediária através da análise da repetibilidade dos dois dias de análise (BRASIL, 2003; ICH, 2014).

5.1.5 Exatidão

Para o ensaio de exatidão, foi avaliada a recuperação através da adição de timol padrão em concentrações conhecidas em amostras de NC branca. Sendo avaliadas três concentrações em triplicata contemplando o intervalo linear do método (1,8; 150 e 350 μ g/mL). Os valores de recuperação foram calculados conforme a equação 3 e expressos em porcentagem.

$$R(\%) = \frac{C_{exp}}{C_{teórica}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: $R(\%)$ é o percentual de recuperação do timol; C_{exp} é a concentração de timol encontrada experimentalmente; $C_{teórica}$ é a concentração de timol teoricamente adicionada à solução de nanocápsulas.

5.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o

uso normal O estudo de robustez foi realizado pelo método de Plackett-Burman, onde foram analisados o efeito de 05 fatores: Percentual de Fase Orgânica na fase móvel (Acetonitrila); temperatura da coluna, pH da fase móvel, fluxo (mL/min) e comprimento de onda - λ (nm). Cada fator foi submetido à análise por CLAE com um nível (valor) abaixo do estabelecido pelo método (-) e outro acima (+). As combinações obtidas estão descritas na Tabela 3.

O desenho experimental – Plackett-Burman – utilizado para a robustez foi o modelo de 12 experimentos e 11 fatores. Sendo testados 05 fatores reais, citados anteriormente, para completar os 11 fatores do experimento, foram incluídos 6 fatores *dummy*. Fatores *dummy* são fatores imaginários para a mudança de um nível a outro, (+) e (-), e não possuem significado físico. Em outras palavras, são as colunas da Tabela 3 as quais não foram preenchidas com parâmetros a sofrerem alterações, tais como temperatura, pH, fluxo etc. Podem, apesar de imaginários, ser utilizados para estimar o erro do experimento, conforme descrito por Heyden e colaboradores (2001) e aplicado por PAIM e colaboradores (2008). Os fatores *Dummy* estão escritos nas colunas da Tabela 3 como D1; D2; D3; D4; D5 e D6.

A Tabela 3 contém a sequência de experimentos, nos níveis especificados, que foram realizados para determinação do efeito dos fatores.

Tabela 3 - Desenho experimental de Plackett-Burman empregado na avaliação da robustez do método analítico para análise do timol por CLAE - DAD.

Experimento nº	D1	D2	FO	Temperatura	D3	D4	D5	pH	Fluxo	λ	D6
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
10	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: D1-6 = fatores *dummy* 1-6; FM = acetonitrila na fase móvel; Temp = temperatura do forno; *Comp* = comprimento de onda.

Os efeitos dos fatores foram calculados de acordo com a Equação 4 (HEYDEN *et al.*, 2001):

$$E_x = \frac{\sum Y (+)}{N/2} - \frac{\sum Y (-)}{N/2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde: E_x é o efeito do fator em análise; $\sum Y(+)$ e $\sum Y(-)$ são a soma das respostas onde x está nos níveis extremos (+) e (-), respectivamente; e N é o número de experimentos do desenho experimental.

O erro experimental foi obtido de acordo com a Equação 5. Para os fatores *dummy* nenhuma alteração física é realizada quando da troca de nível alto (+) para nível baixo (-) e, por isso, o efeito obtido para os fatores *dummy* podem ser considerados como oriundos do erro inerente do experimento.

$$E_e = \frac{\sqrt{\sum E_{dummy}^2}}{n_{erro}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: E_e é a estimativa do erro experimental; $\sum E_{dummy}^2$ é a soma quadrada dos efeitos calculados para os fatores *dummy*; n_{erro} é o número de fatores *dummy* presentes no estudo.

Após o cálculo dos efeitos dos fatores (E_x) e do erro do experimento (E_e) é possível avaliar o efeito dos fatores através da aplicação do teste *t-student* (Eq. 6). O nível de significância do teste estatístico foi estabelecido como $\alpha=0,05$.

$$t = \frac{E_x}{E_e} \quad (\text{Eq. 6})$$

As amostras de padrão e de timol NC foram preparadas de acordo com o descrito como no item 5.1.4 – *Precisão*, preparando-se uma solução de cada amostra, e para cada experimento ambas amostras foram injetadas em duplicata.

5.2 Solubilidade

Para avaliação da solubilidade foram utilizados como meios diluentes água, etanol 15% ou etanol 30% (v/v) (Tabela 4).

As amostras foram preparadas em triplicata, deixando-se 5 mL de cada meio diluente testado em contato com 60 mg de timol, quantidade suficiente para causar saturação de timol no meio. Os sistemas permaneceram sob agitação magnética durante 6 horas em células de Franz mantidas à temperatura de 32 °C.

Após o término do experimento, foram coletadas amostras dos diferentes meios diluentes foram realizadas diluições com etanol 75% (Tabela 4) que finalmente foram quantificadas quanto ao teor de timol por CLAE, conforme metodologia descrita anteriormente.

Tabela 4 - Fatores de diluição utilizados para os meios testados

Meio diluente	Fator de diluição em Etanol 75%
Água MilliQ	1:10
Etanol 15%	1:50
Etanol 30%	1:50

5.3 Preparação das nanocápsulas de timol

A preparação das nanocápsulas foi realizada com base na formulação desenvolvida por LEAL e colaboradores (2015) com patente depositada no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) com registro de número BR1020150087322. O método empregado foi o de deposição interfacial do polímero pré-formado, também conhecido como nanoprecipitação, (FESSI *et al.* 1989). Para tanto, fase orgânica contendo o polímero (PLGA RS 100[®]), a fosfatidilcolina (Lipoid), o óleo (Miglyol[®]) e o fármaco (timol) dissolvidos em acetona (Tabela 5) foi vertida com auxílio de uma seringa em uma fase aquosa contendo tensoativo (Pluronic[®]) sob agitação magnética a temperatura de 40 °C. Em seguida, a suspensão foi concentrada em rota evaporador sob pressão reduzida (0,6 atm, 120 RPM) e temperatura de 40 °C, a fim de se remover todo o solvente orgânico e parte da fase aquosa até um volume de 10 mL. A suspensão de nanocápsulas de timol (NCT) foi mantida em frasco de vidro e conservadas a temperatura ambiente. Ainda, uma formulação branca (NCB) foi

preparada de modo semelhante sem a adição do fármaco na fase orgânica para fins de comparação.

Tabela 5 - Composição quali-quantitativa da NCT

Fase	Componentes	Quantidade
Fase orgânica	Timol	100 mg
	Triglicerídeos de Ác. Capríco/Caprílico	80 mg
	Lipoid	90 mg
	PLGA	40 mg
	Acetona	12 mL
Fase aquosa	Poloxamer (Pluronic)	180 mg
	Água MilliQ (qsp)	20 mL

5.4 Caracterização e estudo de estabilidade da NCT

5.4.1 Avaliação macroscópica

Após o preparo das suspensão de NCT, foi realizada a avaliação organoléptica da formulação onde características como aparência geral da formulação, coloração, presença de sinais de instabilidade como cremeação, precipitação ou separação de fases foram observadas.

5.4.2 Avaliação do pH

A determinação do pH foi realizada pela medida direta do pH, em potenciômetro (DI MAMBRO & FONSECA, 2005).

5.4.3 Avaliação do Tamanho e índice de polidispersão da NCT

A determinação do diâmetro das partículas (D) e o índice de polidispersão (PDI) das amostras foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um equipamento Zetasizer Nano- ZS (Malvern Instruments[®], UK).

As amostras foram preparadas diluindo-se a suspensão de NCT a uma proporção de 1:100 utilizando-se água ultrapurificada. Medidas em triplicata foram realizadas à

temperatura de 25 °C. O ângulo de detecção utilizado foi de 90° (ISO 13321:1996). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão das leituras de cada amostra. O tamanho é obtido através da emissão de feixe de luz pelo equipamento sobre a amostra, onde há espalhamento da luz e sua intensidade oscila a um ritmo dependente do diâmetro das partículas que constituem o sistema fluido (PATTY e FRISKEN, 2006).

O índice de polidispersão também foi avaliado, sendo calculado pelo próprio aparelho, e indica o grau de homogeneidade do diâmetro das partículas (PATTY e FRISKEN, 2006).

5.4.4 *Potencial zeta*

O potencial zeta foi determinado seguindo-se o protocolo experimental semelhante ao descrito anteriormente. Entretanto, o equipamento foi ajustado para módulo de obtenção de potencial de membrana. Todas as medidas foram realizadas com n estatístico igual a 3, sendo os resultados avaliados por um teste algorítmico do próprio software da *Malvern* a fim de aprovação e adequação dentro dos critérios do equipamento (MALVERN, 2004; PATTY e FRISKEN, 2006).

5.4.5 *Eficiência de Encapsulação*

A eficiência de encapsulação foi mensurada submetendo-se alíquotas de 1,5 mL de suspensão de nanocápsulas de timol a centrifugação com rotação de 3000 rpm (840 x g), durante 15 minutos em sistema de filtração de PTFE (Millipore®) de 10.000 ou 100.000 Da, utilizadas para fins de comparação (WATTANASATCHA, RENGPIPAT, WANICHWECHARUNGRUANG, 2012; SANTOS *et al.*, 2013). Amostras retiradas em duas réplicas do filtrado após a centrifugação foram analisadas em triplicata por CLAE de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Para a avaliação do teor total de timol no nanossistema, 200 μ L da suspensão de nanocápsulas foram solubilizados em acetonitrila num volume final de 10 mL e posteriormente analisadas por CLAE-DAD. A eficiência de encapsulação foi calculada empregando a Equação 07.

$$EE(\%) = \frac{(C_T - C_{filt})}{C_T} \times 100\% \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: $EE(\%)$ é a eficiência de encapsulação, em porcentagem; C_T é a concentração total de timol na formulação de NC; C_{fil} é a concentração de timol no filtrado, equivalente ao timol livre.

5.5 Estabilidade

As nanocápsulas obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro incolor que foram armazenados à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C. Foi realizada a caracterização das nanocápsulas de acordo com o item 3.4, sendo avaliadas macroscopicamente e quanto às características físico-químicas, como pH, tamanho e índice de Polidispersão e Potencial Zeta,. O teor de ativo foi quantificado pelo método descrito previamente. As análises foram realizadas em 0, 30, 60 e 90 dias após a preparação do nanosistema.

5.6 Perfil de liberação em células de franz

Os ensaios de perfil de liberação foram conduzidos segundo método descrito por Nielsen (2006). Para o ensaio, foram utilizadas células de Franz modificadas (Figura 5), com $2,5 \text{ cm}^2$ de área de difusão através de membrana de diálise de acetato de celulose (Sigma[®]) com *cut-off* de 12 KDa e 0,015 mm de espessura. No compartimento inferior à membrana foram adicionados 15 mL de etanol 15% (meio receptor), mantido a 32 °C sob agitação magnética. Na parte superior à membrana foi adicionado 1 mL das seguintes formulações: Timol a 8 mg/mL em solução etanólica 75% (v/v) ou como suspensão de NC. Amostras contendo 0,8 mL do meio receptor foram coletadas em 1, 2, 4, 6, 12, 24 horas. A análise do teor de timol nas amostras foi realizado por CLAE - DAD, empregando método descrito no item 5.1. A modelagem matemática dos modelos cinéticos foi realizada com auxílio do Programa Scientist[®] versão 3.0 da Micromath Scientific Software (Louis, Missouri USA).

5.7 Permeação e retenção do timol em pele de orelha de porco com auxílio de células de Franz

Para o estudo de permeação foi empregada pele de orelha de porco dermatomizada (dermatômetro modelo Nouvag[®], 75 mm) e mantida sob baixas temperaturas (-5 °C) por um período máximo de 10 dias. As peles dermatomizadas foram cortadas obtendo-se cortes com área maior que $2,5 \text{ cm}^2$. A espessura dos cortes obtidos foi determinada

com medidas em quintuplicata com auxílio de paquímetro em diferentes posições da pele cortada.

As peles com espessura média entre 230 – 300 μm e DPR < 20% foram aceitas e empregadas na validação da extração do timol da pele e no estudo de permeação.

O ensaio ocorreu da mesma maneira descrita no item 5.6 - Liberação, sendo a pele empregada no lugar da membrana de diálise e as coletas realizadas nos tempos: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 9,0; 12,0 e 24 h após o início do experimento.

Após 24 h do ensaio de permeação foi realizada extração do timol retido na pele. Para tanto, o excesso da formulação em contato com a pele foi lavado com água (2 alíquotas de 1 mL) e papel absorvente foi utilizado para secar a mesma. Posteriormente, a pele foi submetida à técnica de *tape stripping* (HOSMER *et al.*, 2009; HERAI *et al.*, 2007). Nesta técnica, o estrato córneo (EC) é removido com auxílio de fita adesiva (*Scotch 750 3M*[®]) colada sobre a pele e retirada rapidamente para extração do estrato córneo. Esta operação foi repetida 10 vezes. As fitas foram mergulhadas em 2 mL de etanol 40% (diluyente) e submetidas a banho de ultrassom por 5 min a temperatura ambiente em tubo de ensaio com tampa para completa extração do timol. A operação foi repetida e as alíquotas transferidas para BV 5 mL e o volume completado com etanol 40%. O timol presente na pele restante (epiderme+derme) foi extraído e determinado empregando método descrito no item 5.7.1 (Validação Extração do Timol da Pele). As quantidades de timol no estrato córneo e epiderme+derme foram determinadas por método de HPLC descrito no item 5.1 (Desenvolvimento e validação do método analítico).

5.7.1 Validação da extração de timol da pele

Nos cortes de pele com área de aproximadamente 2,5 cm² foram adicionados 10 μL de soluções de timol em etanol 80% (v/v) nas concentrações de 36,0; 7,2 e 1,44 mg/mL. Aguardou-se por 5 min para absorção da solução pela pele. A pele foi então cortada em pequenos pedaços. Adicionou-se 2 mL de etanol 40% (diluyente) e sonicou-se por 5 min a temperatura ambiente em tubo de ensaio com tampa. O sobrenadante foi transferido para BV 5 mL e procedeu-se nova extração com 2 mL de diluyente e sonicação por 3 min. Combinaram-se os volumes de etanol 40% da extração e completou-se o volume do BV de 5 mL com o diluyente. Cada concentração foi realizada em triplicata. Para injeção no CLAE as amostras foram previamente filtradas por filtro PTFE de 0.45 μm . Processo de extração

similar foi utilizado empregando metanol puro como diluente de maneira a determinar o melhor diluente de extração.

Para avaliação da especificidade do método, cortes de pele sem adição de timol e extraídas conforme descrito acima foram preparadas e suas soluções avaliadas por CLAE-DAD.

5.8 Avaliação de citotoxicidade em queratinócitos

A linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) foi adquirida na American Type Culture Collection (ATCC) através do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

O teste do MTT foi realizado em Queratinócitos humanos (5×10^5 células/mL) foram incubados por 24 horas a 37 °C na presença de timol (50 e 100 µg/mL), NCT (50 e 100 µg/mL), DMSO (controle/veículo), NCB (nanocápsula branca), DMEM (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂. Decorrido o período de incubação, 24 horas, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos a 25 °C e o sobrenadante descartado e incubada uma nova solução (200 µL) contendo 10% de MTT, na concentração de 5 mg/mL, e estas células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado então 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan. Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com auxílio de um agitador de placas. A absorvância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e repetidos em três dias diferentes. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual onde foi considerada 100% de viabilidade as células não tratadas (grupo DMEM).

5.9 Avaliação do potencial repelente das NCT ao mosquito *Ae. aegypti* em humano

O ensaio piloto da atividade repelente das NCT em humano foi realizado utilizando-se fêmeas de *Ae. aegypti* inócuas, provenientes do insetário do laboratório de Bioprospecção da UFC, sob a coordenação da Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.

Os voluntários apresentaram leve ou nenhuma sensibilidade a picadas de mosquito como critério de escolha. Além disso, não foi permitido o uso de fragrâncias durante

o ensaio nem fumar nas 12 horas anteriores. Os mosquitos foram criados, mantidos e testados (em sala isolada) a 27 ± 2 °C de temperatura, e um fotoperíodo de 12/12 h (luz: escuro) (WHO, 2009).

No ensaio foi exposta uma área de 5 cm² de cada antebraço do voluntário (n=3), sendo o antebraço direito, tratado com 500 µL de NCT, e simultaneamente o braço esquerdo não tratado, usado como controle negativo. A repelência foi mensurada pelo percentual de pousos ou picadas da área tratada com NCT em relação ao controle negativo. As avaliações ocorreram em 5, 60, 120 e 180 min após a aplicação das NCT, e o tempo de exposição aos mosquitos foi de 3 minutos/avaliação (WHO, 2000; WHO 2009; GILLIJ, 2008).

5.10 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio de softwares (GraphPad Prism, Excel etc) de acordo com a natureza do ensaio, como validação analítica, ensaio biológico e outros. Os resultados estão expressos como a média \pm EPM, DP ou DPR. A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student, comparação entre duas médias, ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Dunnett, como teste *post hoc*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Na validação foi realizado teste *F*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo envolveu a preparação de suspensões de nanocápsulas de timol (monoterpeno bioativo), que foram caracterizadas quanto aos aspectos morfológicos e físico-químicos (tamanho de partícula, potencial zeta, pH, teor de ativo etc), além de avaliação da permeação e retenção cutânea, da segurança *in vitro* e do potencial repelente de inseto (*Ae. aegypti*).

6.1 Desenvolvimento e validação de método analítico

A detecção e quantificação de substâncias bioativas em formulações a serem empregadas no tratamento ou prevenção de doenças, é essencial para o controle e garantia da qualidade desses produtos (BRASIL, 2003). Dessa forma, inicialmente o presente estudo envolveu a análise cromatográfica da NCT, um produto com pretensão de uso tópico, como repelente de inseto que é classificado como cosmético de Grau 2. Produtos com esta classificação requerem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (BRASIL, 2005). No presente estudo, foi desenvolvida metodologia para quantificação de timol e realizada validação avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003)

Estudos anteriores (LEAL *et al.*, 2003; MORAES, 2011) do nosso laboratório realizou análise cromatográfica (CLAE-DAD) do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) ou timol. A metodologia empregada nesses estudos anteriores serviu como ponto de partida para a obtenção do método analítico utilizado no presente trabalho através da modificação de alguns parâmetros. A otimização desse método anterior propiciou alterações que requereram uma validação analítica.

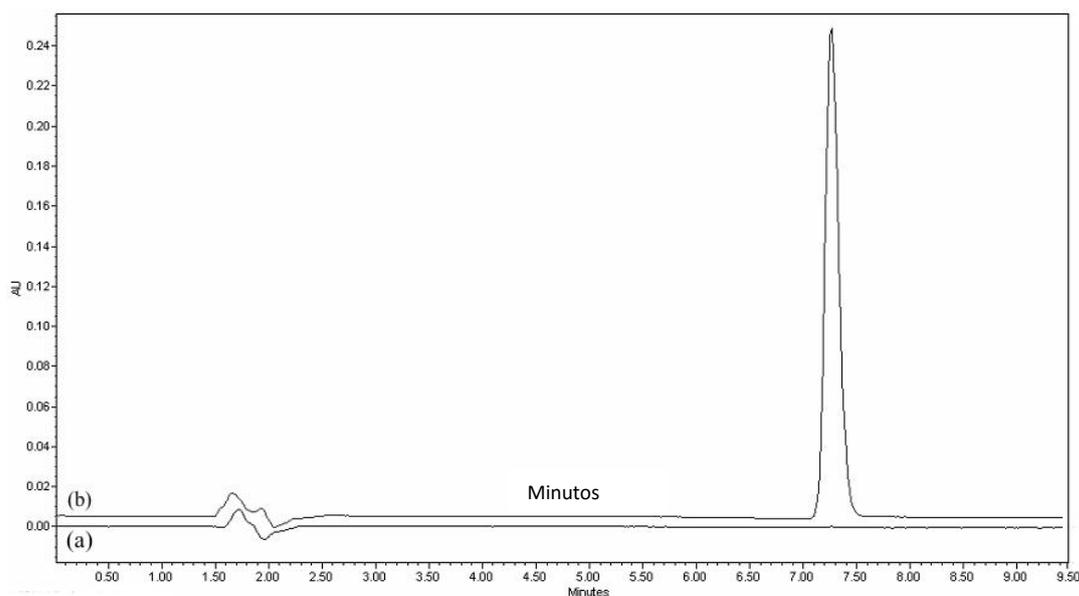
6.1.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade que este possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A Figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos no ensaio da especificidade. Não se verifica presença de pico no cromatograma da NC branca na região do tempo de retenção

do timol (aproximadamente 7,3 min). Este resultado indica a especificidade do método cromatográfico em relação aos componentes da formulação das NC (SHABIR, 2003; ICH, 2014).

Figura 7 - Cromatogramas em 276 nm da Nanocápsula Branca (a) e Nanocápsula de Timol (b).



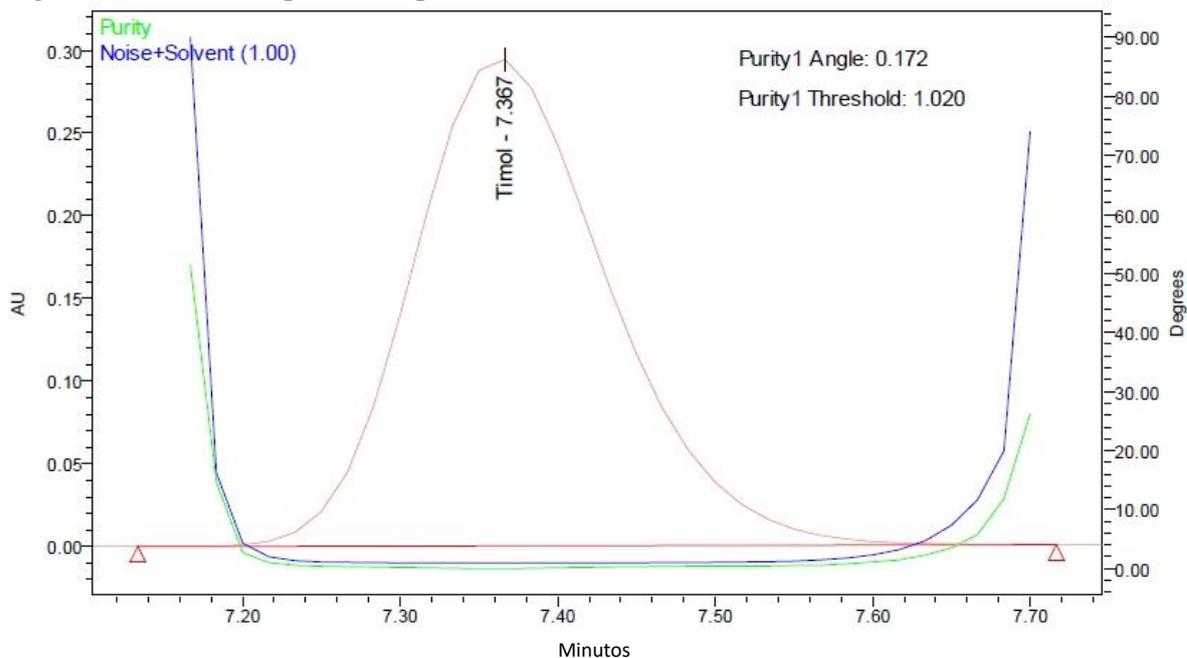
A pureza de pico determinada por detectores de arranjo de diodos (DAD) é uma ferramenta útil na detecção de substâncias que possam estar sendo eluídas juntamente com o analito de interesse. A análise da pureza de pico aumenta a segurança em relação às afirmações sobre a especificidade de um método cromatográfico e é muito útil durante o desenvolvimento de métodos analíticos (MIRON *et al.*, 2014).

A determinação da pureza de pico consiste na análise vetorial de espectros extraídos de diferentes pontos de um pico cromatográfico. Quanto mais similares os espectros, mais próximo a zero é o ângulo entre estes vetores, indicando que o pico é espectralmente homogêneo (WATERS, 1998; SANCHEZ, 1996). É interessante que se compare o ângulo de pureza de pico com o ângulo de *threshold*. O ângulo *threshold* inclui a influência do solvente e do ruído do detector que causam variações nos espectros coletados. Quando o ângulo de pureza é maior que o ângulo de *threshold* significa que as mudanças nos espectros no decorrer do pico não podem ser explicadas pelo ruído e efeito do solvente restando a hipótese de que outra substância encontra-se coeluído com o analito de interesse.

A Figura 8 apresenta o resultado da pureza do pico do timol na amostra NC branca + Timol padrão. O ângulo de pureza foi de 0,172, próximo a zero e menor que o

threshold (1,020), demonstrando assim que o método não detectou a presença de impureza no pico do timol. Pode-se observar também que a curva de pureza (curva verde) não intersecta a curva *threshold* (curva azul), confirmando que em nenhuma região do pico foi detectado impureza. Isso mostra que não verificou-se a presença de impurezas coeluinto com o timol e interferindo no seu pico, confirmando assim a especificidade do método.

Figura 8 - Gráfico da pureza de pico do timol em amostra contendo fármaco+NC branca.



6.1.2 Linearidade

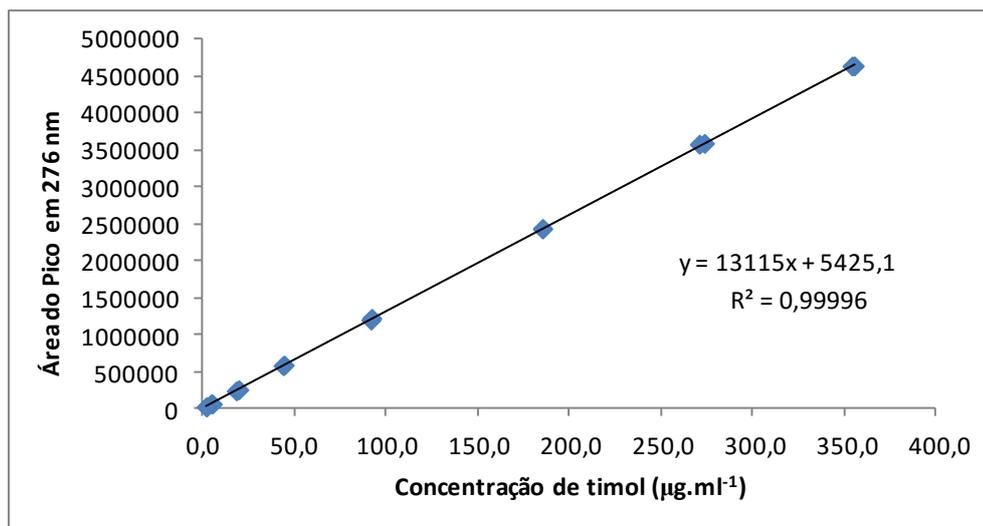
A linearidade consiste na capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (ICH, 2014). A RE 899/03 recomenda a observação de relação linear aparente após exame visual do gráfico e coeficiente de correlação linear superior a 0,99 (BRASIL, 2003). No estudo de linearidade, foi realizada análise dos coeficientes de determinação, angular e interseção, além da análise dos resíduos.

A análise dos resultados do ensaio de linearidade demonstrou o aumento gradual e proporcional do sinal do detector UV (área do pico em 276 nm) com o aumento da concentração de timol (Figura 9).

A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e ficou definida como $y = 13115x + 5425,1$, onde y é a área do pico em 276 nm e x a concentração de

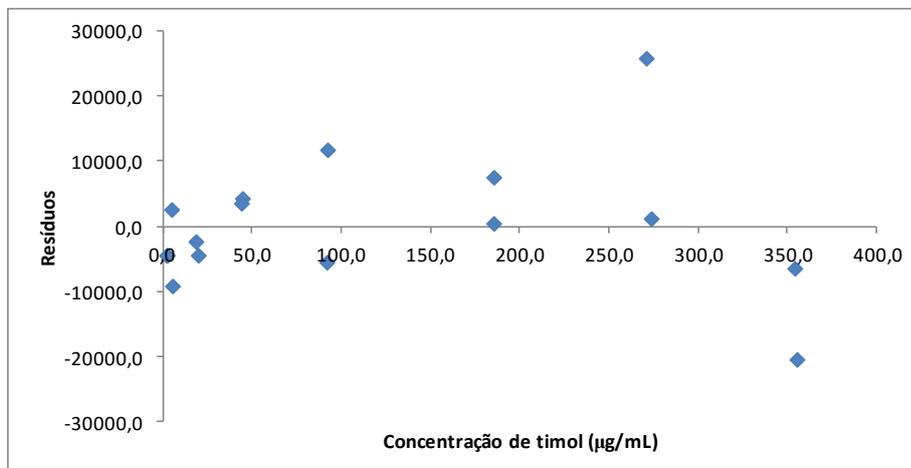
timol, em $\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de determinação (r^2) foi igual a 0,9999 indicando que praticamente toda variação observada na área do pico é explicada pela variação na concentração do timol (BRASIL, 2003; ICH, 2014).

Figura 9 - Curva de calibração do timol por CLAE-DAD com detecção em 276 nm e respectiva equação da reta e coeficiente de determinação obtidos por regressão linear.



A análise dos resíduos é uma importante ferramenta para análise visual e identificação de tendências ou presença de valores atípicos (*outliers*) que podem indicar desde a seleção de modelo pouco adequado para descrição dos resultados até a alteração significativa de parâmetros como coeficiente angular e intercepto (MIRON *et al.*, 2014). A análise visual dos resíduos do ensaio de linearidade não detectou tendência na distribuição dos resíduos nem a presença de valores atípicos e, por isso, os resíduos foram considerados como tendo distribuição normal sem a presença de *outlier* (Figura 10). Este resultado indica a adequabilidade do modelo linear proposto e a melhor predição para os valores de coeficiente angular (13115) e do intercepto (5425,1).

Figura 10 - Gráfico dos resíduos do ensaio de linearidade do timol por CLAE-DAD com detecção em 276 nm.



O erro padrão residual (EPR) da curva analítica é um indicativo da precisão dos resultados do ensaio de linearidade. A equação 8 descreve a obtenção de parâmetro que avalia a precisão da regressão linear que é obtido de maneira semelhante ao desvio padrão relativo (DPR), calculado no ensaio de precisão (ERMER & PLOSS, 2005). A precisão da regressão calculada com a equação obteve valor de 0,66% e está de acordo com a variação esperada no ensaio de precisão que é de até 5,0%, conforme RE 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003).

$$DPR_{REG} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \times 100\% = \frac{EPR}{b \times \bar{X}} \times 100\% \quad \text{Eq. 8}$$

Onde: \hat{Y}_i é o valor esperado; Y_i é o valor obtido, b é o coeficiente angular; \bar{X} é a média da concentração do analito e n é o número de análises.

Considerando os resultados expostos o método analítico proposto foi considerado linear na faixa de 1,8 a 355 µg/mL de timol.

6.1.3 Limites de Detecção e de Quantificação

A Tabela 6 resume os resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação calculados a partir dos parâmetros de regressão linear obtida com as concentrações mais baixas (e mais próximas aos limites de detecção) da curva padrão (1,8 a 40 µg/mL). Os valores de limites de detecção e quantificação foram de 0,43 e 1,44 µg/mL,

respectivamente. Os valores de concentração baixos obtidos são capazes de determinar a quantidade de timol nos primeiros pontos de amostragem nos estudos de permeação e liberação do timol a partir de NC.

Tabela 6 - Determinação dos limites de detecção e quantificação do método analítico (CLAE-DAD) para quantificação do timol na NCT.

Inclinação	Intercepto	R²	DPRreg	DP Intercepto
13302	334	0,9998	1,60%	1910
Limite de detecção (µg/mL)		Limite de Quantificação (µg/mL)		
0,43		1,44		

6.1.4 Precisão

De acordo com a Tabela 5, que apresenta os resultados do ensaio de precisão para as NC de timol, os valores de DPR foram 2,36% para o Analista 1 e de 1,91 para o analista 2. Tais valores foram inferiores ao limite estabelecido pela RE 899/2003, que é de 5,0%, portanto foram considerados adequados (BRASIL, 2003). A precisão intermediária foi calculada através da obtenção do desvio padrão relativo (DPR%) considerando as determinações obtidas pelos dois analistas (n = 12). O valor de 2,39% foi considerado satisfatório demonstrando que analistas diferentes conseguem determinar o teor de timol nas formulações de NCT com mínimo desvio. O teste F compara a variância de dois conjuntos de dados e foi utilizado para avaliação estatística dos resultados de precisão. O valor de probabilidade (*p*) calculado foi de 0,311, ou seja, bem superior ao valor estabelecido para o teste de hipóteses ($\alpha = 0.05$). Assim, pode-se afirmar que não se verificou diferença significativa entre as variâncias dos resultados dos dois analistas, confirmando a precisão do método analítico proposto.

Tabela 7 - Avaliação da precisão do método (CLAE-DAD) para dererminação do teor do timol na NCT (276 nm).

	Analista 1	Analista 2
	6,93	7,11
	6,96	6,88
Concentração de timol nas nanocápsulas (mg/mL)	6,86	6,73
	7,18	6,98
	7,28	6,84
	7,17	6,86
Média (mg/mL)	7,06	6,90
DPR	2,36%	1,91%
Média Geral (mg/mL)		6,98
DPR		2,39%
Variâncias	0,0278	0,0174
Valor de p (Teste F)		0,311
Repetibilidade de Injeção	0,66%	0,15%

A repetibilidade de injeção é uma medida da precisão dos resultados gerados pelo sistema cromatográfico. Cada amostra do ensaio de precisão foi injetada em duplicata. Nestas condições, pode-se determinar a repetibilidade de injeção com a equação 9 (ERMER, 2001). Os valores de repetibilidade de injeção obtidos foram 0,66 e 0,15% e foram considerados satisfatórios, uma vez que a Farmacopéia Européia estabelece valor limite de 0,73% para condições semelhantes (European Pharmacopeia, 2013). É importante ressaltar que os baixos valores de repetibilidade de injeção determinam baixa influencia deste parâmetro na variação total do experimento que é estabelecido pelo ensaio de precisão. Isso indica que a injeção em triplicata de cada amostra não melhora de forma significativa a variação dos resultados obtidos quando a repetibilidade de injeção já é baixa, ou seja, $DPR < 5,0\%$. Assim, o uso de duplicatas de injeção, em vez de triplicatas, na análise de amostras de timol pode ser considerado adequado levando a redução no tempo de uso do equipamento e também dos solventes e reagentes empregados na preparação da fase móvel.

$$RepInj(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (Y_{r1} - Y_{r2})^2}{2n}} \times 100\% \text{ Eq.}$$

Onde Y, r_1 e Y, r_2 são as respostas observadas pela mesma amostra para as injeções r_1 e r_2 , respectivamente.

A Tabela 8 resume os resultados do ensaio de exatidão. Nas concentrações mais altas (345 - 350 $\mu\text{g/mL}$) de timol a exatidão foi próxima a 100% com precisão adequada (DPR < 5.0%). Para concentração mais baixa (aproximadamente 1,8 $\mu\text{g/mL}$), próxima ao limite de quantificação inferior, o valor de recuperação foi de 85,5% com precisão de 10,2%. A concentração de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ será empregada somente nos estudos de permeação pela pele e a RE 899/03 estabelece faixas de aceitação entre 80 – 120% para ensaios bioanalíticos com variação (DPR) de até 20% para concentrações próximas ao limite de quantificação inferior. Assim, pode-se considerar que o método é exato no intervalo linear e resultados com maior variação e menor exatidão são esperados para concentrações próximas ao limite de quantificação inferior.

Tabela 8 - Avaliação da exatidão do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol na NCT.

Região da curva de calibração	Conc. Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Média(%)	DPR(%)
Alta	347,9	355,8	102,3	101,8	0,54
	345,5	357,0	101,9		
	350,0	354,1	101,2		
Média	145,0	146,7	101,2	100,4	0,86
	149,3	150,2	100,6		
	151,2	150,4	99,5		
Baixa	1,86	1,40	75,4	85,5	10,2
	1,85	1,68	90,6		
	1,83	1,65	90,4		

6.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de variações deliberadas nos fatores considerados críticos para quantificação do timol – pH da fase móvel, composição da fase móvel, temperatura do forno, fluxo e comprimento de onda. Os fatores e níveis estudados para a realização do estudo de robustez estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Fatores e níveis estudados no ensaio de robustez do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol em timol em NC.

Fatores	Nominal	Limites	Nível Estudado (-)	Nível estudado (+)
pH	4.0	0.5	3.5	4.5
Acetonitrila na fase móvel (%)	60	2	58	62
Temperatura do forno (°C)	32	5	27	37
Fluxo (mL/min)	1.2	0.1	1.1	1.3
Comprimento onda (nm)	276	2	274	278

Os fatores foram avaliados utilizando desenho fatorial fracionado – Placket-Burman – para 11 fatores e 12 experimentos. Foram incluídos 6 fatores “dummy” para completar o experimento que também podem ser utilizados para estimar o erro do experimento, conforme descrito por Heyden e colaboradores (2001) e aplicado por Paim e colaboradores (2008).

A Tabela 10 apresenta os resultados do ensaio de robustez. Os valores de probabilidade (p) foram maiores que o valor crítico estabelecido ($\alpha=0,05$) e, por isso, pode-se considerar que nenhum dos fatores avaliados (fase móvel, temperatura do forno, pH da fase móvel, fluxo e comprimento de onda) afetou de forma significativa a quantificação do timol em NC. Além disso, o baixo valor de DPR (0,70%) foi condizente com a variabilidade obtida nos estudos de precisão. Assim, pode-se considerar o método robusto em relação aos fatores avaliados.

Tabela 10 - Avaliação da robustez do método (CLAE-DAD) para determinação do teor de timol em timol em NC.

Exp nº	D1	D2	FO	Temp	D3	D4	D5	PH	Fluxo	Comp	D6	Conc timol (mg/mL)
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	7,288
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	7,404
3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	7,390
4	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	7,332
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	7,421
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	7,363
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	7,414
8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	7,470
9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	7,380
10	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	7,400
11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	7,424
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	7,465
Efeito (+)	7,39	7,38	7,40	7,37	7,38	7,39	7,38	7,40	7,40	7,38	7,41	7,396*
Efeito (-)	7,40	7,41	7,39	7,43	7,41	7,40	7,41	7,39	7,39	7,41	7,38	0,696**
Efeito	0,00	-0,03	0,01	-0,06	-0,03	-0,01	-0,03	0,02	0,01	-0,04	0,03	
Erro	0,0268											
t calc =			0,536	-2,225				0,643	0,188	-1,356		
p =			0,611	0,068				0,544	0,857	0,224		

* media dos resultados; ** desvio padrão relativo dos resultados.

6.2 Preparação e caracterização de nanocápsulas de timol (NCT)

A caracterização de um nanossistema é imprescindível em todas as etapas, desde seu desenvolvimento, produção, armazenamento e como monitoramento da estabilidade do produto. Dentre as características de maior relevância e que podem servir como parâmetro de qualidade da formulação obtida estão o aspecto macroscópico, morfológico, tamanho e distribuição de tamanho da partícula, potencial zeta, pH das suspensões, taxa de associação e da forma de associação do fármaco e cinética de liberação do fármaco (ZAMPIERI, 2009). Tais parâmetros podem sofrer alterações tais como reações químicas e físicas, por exemplo, alterações no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, agregação das nanopartículas no meio, formação de precipitados, oxidação e hidrólise desencadeadas muitas vezes pela qualidade dos insumos utilizados, metodologia e aparelhagem utilizada ou até mesmo por fatores ambientais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

No presente trabalho, foram avaliados pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, teor por CLAE e eficiência de encapsulação utilizando a metodologia de ultracentrifugação. A formulação de NCT foi preparada, independentemente,

por duas vezes para avaliação das características físico-químicas durante o estudo de estabilidade ($n = 2$) e foram identificadas como NCTr1 e NCTr2.

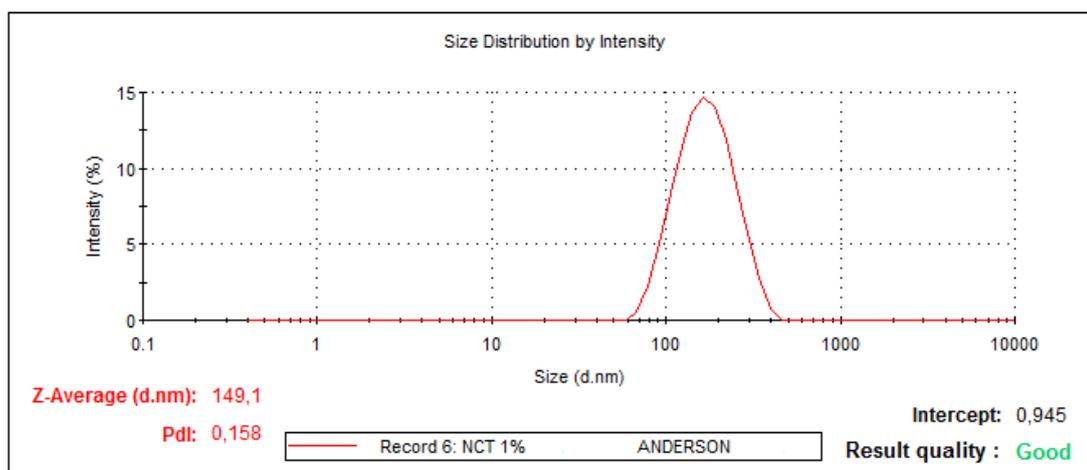
As amostras de nanocápsulas obtidas apresentaram-se brancas, opacas e com aspecto leitoso. Estas propriedades visuais são características das suspensões de nanocápsulas com concentração elevada de fase oleosa (SILVEIRA, 2015).

A determinação e o controle do pH de formulações cosméticas de uso tópico tem papel importante, pois o pH sofre influencia do tipo e solubilidade da substância ativa na fase externa. Além disso, a estabilidade dos componentes da formulação pode ser pH-dependente. As suspensões de nanocápsulas devem ser, preferencialmente, de pH ligeiramente ácido, o que corresponde ao pH fisiológico da pele. Essa condição propicia à pele proteção contra bactérias e fungos (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002; POLETTO *et al.*, 2011).

Os valores de pH obtidos por leitura direta das nanocápsulas foram de 3,70 e 3,56 para NCTr1 e NCTr2, respectivamente. Este pH ácido é levemente inferior ao pH fisiológico da pele reportado como sendo de 4,0 a 6,0 (LAMBERS *et al.*, 2006). Estes valores de pH pode ser justificado pela presença de substâncias de caráter ácido na formulação, incluindo o ácido caprílico e o polímero PLGA.

As duas amostras da formulação apresentaram diâmetro médio de partícula de 147,7 e 145,8 nm e encontram-se dentro da média de tamanho obtido pelo método de nanoprecipitação (100 e 300 nm) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os valores de PDI encontrados para as duas réplicas de NCT foram 0,16 e 0,18. O PDI é uma medida da dispersão do tamanho de partícula e resultados inferiores a 0,2 são considerados adequados enquanto que valores acima deste aumentam o erro na estimativa do diâmetro médio da partícula, sendo que para $PDI > 0,5$ o equipamento perde o poder de determinação do diâmetro médio (MALVERN, 2004). Dessa forma, o diâmetro médio das NCT encontrado foi dentro do esperado, considerando o método apropriado, cumprindo aos preceitos de um nanossistema, com uma estreita faixa de variação quanto ao diâmetro (Figura 11). Ademais, os resultados de diâmetro e PDI próximos para duplicata indicam que o método de obtenção das NCT é reprodutível em relação aos parâmetros citados.

Figura 11 - Gráfico de Diâmetro e PDI das NCT



Os valores do potencial zeta, que reflete a carga de superfície das nanopartículas, apresentaram valores médios de $-28,97$ e $-26,70$ mV (Tabela 11). O potencial zeta é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante e grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões entre nanopartículas próximas. Valores próximos a ± 30 mV são importantes para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, já que grandes forças repulsivas previnem a agregação das partículas (LEGRAND, 1999). O valor de potencial zeta da formulação em torno de -30 mV é tipicamente observado para estes tipos de sistema e devido, principalmente, a carga de superfície da nanopartícula gerada pelo polímero ácido PLGA. Resultado semelhante foi encontrado por MELO e colaboradores (2009), em nanocápsulas de benzocaína com o polímero PLGA (SHAFFAZICK *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Tabela 11 - Medida de diâmetro de partícula, PDI e potencial zeta da NCT no estudo de estabilidade no tempo zero. Resultados expressos como a média \pm DP para $n=3$.

Formulação	Diâmetro (nm)	PDI (nm)	Potencial zeta (mV)
NCTr1	$147,7 \pm 1,21$	$0,187 \pm 0,027$	$-28,97 \pm 1,62$
NCTr2	$145,8 \pm 0,68$	$0,166 \pm 0,019$	$-26,70 \pm 3,22$

NCTr1 - 2: Nanocápsula de timol réplica 1 e 2, respectivamente.

Na Tabela 12 e Tabela 13 estão descritos o teor de timol nas nanocápsulas, determinado por CLAE-DAD e os dados relacionados à eficiência de encapsulação, respectivamente. Os filtros de 10 KDa e 100 KDa tiveram resultados semelhantes para eficiência de encapsulação com diferença de 0,78%. Filtros de 10 KDa tem sido extensamente

utilizados para a determinação deste parâmetro em publicações que realizam o ensaio de ultracentrifugação. Santos e colaboradores (2013) realizaram o ensaio com metodologia semelhante à do presente trabalho utilizando filtros de 10 KDa para determinar a eficiência de encapsulação de nanocápsulas de clotrimazol com tamanho médio de 150 nm. Os autores encontraram eficiência de encapsulação maior do que 99,9%, que foi associada à elevada lipofilicidade da droga que impede a sua partição na fase aquosa. O timol também apresenta alta lipofilia e provavelmente pelo mesmo motivo mostrou alta eficiência de encapsulação, com média de $98,43 \pm 0,10\%$.

Tabela 12 - Teor de timol das nanocápsulas .

	Média	DPR	Rendimento (%)
NCTr1	0,85	5,23%	85,39%
NCTr2	0,91	5,93%	91,13%

Tabela 13 - Eficiência de encapsulação para formulação de nanocápsulas de timol.

Timol NC (mg/mL)	Concentração no filtrado (mg/mL)		Eficiência de Encapsulação (%)	
	10 KDa	100 KDa	10 KDa	100 KDa
7,296	120,02	165,66	98,35	97,73
	109,41	170,58	98,50	97,66
Média	114,71	168,12	98,43	97,70
DPR (%)	6,54%	2,07%	0,10%	0,05%
Média de timol livre			1,45	2,23

Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

Wattanasatcha e colaboradores (2012) utilizaram sistema de filtração de 100 KDa para nanoesferas de timol com tamanho médio de $420 \pm 118,6$ nm e obtiveram 77% de eficiência de encapsulação. Diante do exposto, pode ser observado que o estudo de eficiência de encapsulação de nanossistema para ultracentrifugação tem envolvido o emprego tanto de filtros de 10 KDa quanto de 100 KDa. No presente estudo, o ensaio realizado com o sistema

de filtração de 100 KDa teve intuito de verificar uma possível intercambiabilidade dos dois tipos (WATTANASATCHA, 2012) e verificando-se o resultado obtido de $97,70 \pm 0,05\%$, representando uma diferença de 0,78%, pode-se inferir que é possível realizar o ensaio de eficiência de encapsulação através da ultracentrifugação utilizando-se o sistema de filtração de 100 KDa para partículas com esse tamanho médio.

Outra maneira de escolher o sistema de filtração seria relacionando-se o tamanho das partículas do nanosistema com a porosidade do filtro. Tal relação não seria tão simples de se realizar já que os filtros encontrados especificam a porosidade por Dalton, unidade de massa molar para proteínas esféricas, enquanto que na caracterização das nanocápsulas, obtém-se o diâmetro das partículas como medida de tamanho (nm). Para realizar tal conversão, também se faz necessário ter dados de densidade dos constituintes da nanocápsula, o que dificulta ainda mais, por conta de ser uma matriz complexa, com mistura de polímero, triglicérides e o timol. Erickson (2009) descreve a equação de interconversão, para partículas esféricas, de medida de volume (em nm) e massa (em KDa).

$$V = \frac{10^{21}}{p \times 6,03 \cdot 10^{23}} \times 1.000 M \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde: V é o volume em nm^3 ; 10^{21} é o fator de conversão de cm^3 para nm^3 ; p é a densidade da partícula em g/cm^3 ; $6,03 \cdot 10^{23}$ é o número de avogrado e converte a massa para partícula; 1.000 é o fator de conversão de KDa para Da; M é a massa em KDa da partícula em análise.

Sendo a relação de volume (V) e diâmetro (d) estabelecido por:

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 \rightarrow d = 2 \times \sqrt[3]{\frac{3 \times V}{4\pi}} \quad (\text{Eq. 11})$$

A título de cálculo a densidade da partícula foi considerada $1,0 \text{ g}/\text{cm}^3$, pois trata-se de um valor próximo ao componente oleoso do núcleo da nanocápsula (ácido caprílico como ácidos graxos de cadeia média – densidade aproximada de $0,95 \text{ g}/\text{cm}^3$) e do polímero PLGA ($1,3 \text{ g}/\text{cm}^3$).

A Tabela 14 resume as relações de diâmetro e volume de partícula com o *cut-off* dos filtros utilizados na eficiência de encapsulação empregando as equações descritas anteriormente (Eq. 10 e 11). O filtro com *cut-off* de 10 KDa deve reter partículas com diâmetro maior que 3,2 nm, enquanto que o filtro de 100 KDa retém partículas maiores que 6,8. A Figura 11 (Gráfico do tamanho de partícula) apresenta a distribuição do tamanho de

partícula das NCT e pode-se observar que não se verifica a presença significativa de partículas com diâmetro menor que 20 nm. Assim, o valor de timol encontrado no filtrao deve ser uma boa estimativa da concentração de timol livre na formulação de NCT.

Tabela 14 - Relação de diâmetro e volume de partícula com o cut-off dos filtros utilizados na eficiência de encapsulação.

Cut-off do filtro (KDa)	Volume da partícula (nm³)	Diâmetro da particular (nm)
10	16,6	3,2
100	165,8	6,8

A partir dos resultados facilmente se obtém os valores de timol livre nas NC que foram 1,45 e 2,33% para filtro de 10 KDa e 100 KDa, respectivamente. O valor de eficiência de encapsulação do filtro de 10 KDa foi utilizado, quando necessário, no decorrer o presente trabalho.

6.3 Estudo da estabilidade das NCT

Estudos de estabilidade são essenciais para a avaliação das características físico-químicas da formulação pelo período e condições de estocagem do produto. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003 ABDELWAHED *et al.*, 2006). Diante do exposto, foi realizado um estudo de estabilidade (0, 30, 60 e 90 dias) para a NCTr1 e NCTr2. Foram avaliados os seguintes parâmetros: avaliação macroscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração do fármaco, pH e teor de timol.

Para obtenção de informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanocápsulas pode-se realizar leitura do pH em função do tempo e modificações nos valores desse parâmetro podem ser indicativas de algum tipo de degradação do polímero e/ou de algum outro componente da formulação (GUTERRES *et al.*, 1995; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O pH manteve-se praticamente constante durante os 90 dias de estudo de estabilidade, variando de 3,63 (tempo zero) para 3,57 (90 dias) (Tabela 15). Este resultado sugere estabilidade dos constituintes da NCT com manutenção da acidez do meio propiciado por constituintes como o PLGA e ácido caprílico.

A medida do diâmetro das partículas tem sido um importante parâmetro para o estudo da estabilidade de sistemas nanoparticulados, uma vez que a deposição de polímero

pré-formado conduz à diminuição de tamanho de partícula em relação às emulsões devido a um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Além disso, o monitoramento do tamanho pode revelar tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas em função do tempo (CALVO, 1996; MOLPECERES, 1997). Em relação ao diâmetro das partículas das NCT, manteve-se estável até o 60º dia de estudo (diâmetro de $144,7 \pm 1,5$), porém houve um acréscimo no 90º dia, $172,6 \pm 1,1$ nm, esse aumento está possivelmente relacionado a uma tendência à agregação ou sedimentação, conforme observado por MÜLLER-GOYMANN (2004). Porém, o índice de polidispersão manteve-se estável com valores variando de $0,176 \pm 0,024$ a $0,182 \pm 0,010$, estando portanto dentro da faixa aceitável, ou seja, inferior a 0,2 (ALVES, 2007).

Análises do potencial zeta durante o período de estudo (0, 30, 60 e 90 dias) revelaram que a carga negativa foi mantida com oscilações nos valores ($27,83 \pm 2,60$ a $-23,47 \pm 1,70$), com decréscimo da ordem de 4,5 a 21,7%. Alterações no referido parâmetro podem indicar mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Além disso, pode-se relacionar alterações no potencial zeta à associação do fármaco às nanopartículas, como, por exemplo, foi demonstrado por Alonso e colaboradores (1990), os quais verificaram que o aumento da taxa de associação do fármaco em estudo (sulfato de amicacina) estava relacionado à diminuição em módulo do potencial zeta das nanopartículas, sendo sugerido pelos autores a ocorrência de interação eletrostática entre o fármaco e o polímero (policianoacrilato de butila). Dessa forma, as oscilações nos valores do potencial zeta podem explicar, pelo menos em parte, o aumento no diâmetro das partículas observado durante o estudo da estabilidade, porém estudos adicionais são necessários.

Tabela 15 - Estudo de estabilidade da NCT: caracterização quanto ao diâmetro (D), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), teor e pH.

Dia	D (nm ± DP)	PDI (± DP)	PZ (± DP)	Teor (± DP)	pH
1	146,8 ± 1,3	0,176 ± 0,024	-27,83 ± 2,60	100,0%	3,63
30	143,0 ± 1,5	0,154 ± 0,007	-21,77 ± 3,43	86,1%	3,86
60	144,7 ± 1,5	0,154 ± 0,013	-26,57 ± 1,38	80,5%	3,64
90	172,6 ± 1,1	0,182 ± 0,010	-23,47 ± 1,70	81,9%	3,57

Resultados expressos como média ± desvio padrão para $n = 2$.

O teor do timol nas nanocápsulas apresentou um decréscimo no 30º dia de estudo, aproximadamente 14%, porém pôde-se considerar estável nos demais dias de estudo, com teor médio mínimo de 80,5%. Este perfil de degradação pode ser justificado pela presença de equilíbrio entre o timol e seu produto de degradação através da interconversão destas espécies. Contudo, a análise cromatográfica não detectou a presença de pico adicional. Desta forma, uma segunda hipótese pode ser levantada. A estabilização na queda do teor de timol pode ser devida a diferentes formas de associação do timol com a nanopartícula. Uma parte do timol (aproximadamente 20%) estaria facilmente em equilíbrio com o conteúdo de timol no meio aquoso, ou seja, ligado fracamente na superfície da partícula e a perda de teor pode ter ocorrido por evaporação (LI *et al.*, 2012). O restante do timol pode estar fortemente ligado ao conteúdo oleoso da nanopartícula e seu conteúdo ser de difícil perda por evaporação.

6.4 Solubilidade

Os resultados do ensaio da solubilidade do timol em diferentes diluentes encontram-se resumidos na Tabela 16. A água apresentou baixa solubilidade e foi o meio em que o timol apresentou menor solubilidade. O aumento da porcentagem de etanol causou aumento na solubilidade do timol. O meio dissolutor contendo 15% de etanol apresentou, em média, mais de sete vezes a concentração de timol encontrada na água. O etanol 30% teve solubilidade 1,49 vezes (aumento de 49%) maior que a solubilidade do etanol 15%.

Tabela 16 - Solubilidade da timol a 32 °C em diferentes meios de dissolução.

	Solubilidade a 32 °C (mcg/mL)		
	Água	EtOH 15%	EtOH 30%
Repetição 1	282,5	2042,3	3061,1
Repetição 2	317,6	2560,6	4719,9
Repetição 3	508,7	3568,2	4546,7
Repetição 4	477,7	3178,0	4536,9
Média	396,6	2837,3	4216,1
DP	113,2	673,0	774,6
DPR	28,5%	23,7%	18,4%
Classificação*	Muito pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco Solúvel
Sink (µg/mL)**	59,5	425,6	632,4

* Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010);

** Condição sink – neste caso considerado como sendo a concentração de fármaco equivalente a 15% do valor da solubilidade.

A condição *sink*, em relação à solubilidade, pode ser definida como a garantia que a concentração do meio não exceda 10-20% da concentração de saturação do fármaco e é importante para garantir que a transferência de massa não seja significativamente influenciada pela difusão do fármaco para o meio receptor (FIP, 1981; ALLEN *et al.*, 2011). Meios receptores de estudos de liberação e permeação empregam, preferencialmente, diluentes aquosos. Em casos de baixa solubilidade do fármaco solventes orgânicos podem ser adicionados para aumentar a solubilidade.

Considerando a concentração máxima de timol de 400 µg/mL, calculada a partir da Equação 12, observou-se que não poderá ser usada água como meio receptor, pois condição sink não seria garantida. O etanol 15% garante as condições de solubilidade estimadas para condição sink e foi escolhido como meio receptor nos estudos de permeação e liberação por célula de Franz em detrimento do etanol 30%. De maneira geral, é recomendado o uso do menor percentual de solvente orgânico como meio receptor para que as

condições físico-químicas do ensaio sejam as mais próximas possíveis dos sistemas biológicos.

$$C_{\text{máx}} = \frac{V_F \times C_F \times f_P}{V_R} \quad (\text{Eq. 12})$$

6.5 Liberação

O ensaio de liberação teve finalidade de verificar se a formulação é capaz de liberar a substância ativa e a quantidade liberada em um intervalo de tempo, de modo a caracterizar o sistema quanto ao modelo cinético de liberação. O estudo foi conduzido com solução etanólica a 15% como meio receptor, definida no ensaio de solubilidade, por ser capaz de solubilizar o ativo em concentração superior à maior concentração possível (400 µg/mL) no ensaio de liberação e permeação *in vitro*, critério adotado com base em estudo anterior (NIELSEN, 2006).

A Tabela 17 resume os resultados da difusão das formulações de timol através da membrana de acetato de celulose pela expressão do fluxo de massa por centímetro quadrado por tempo. A solução de timol teve maior fluxo que a formulação de NC (Figura 12).

Tabela 17 - Difusão para ensaio de liberação de timol através de membrana de diálise.

Tempo (h)	Fluxo médio (µg/cm ²)*		DP do fluxo(µg/cm ²)*	
	timol	NCT	timol	NCT
1	74,9	28,2	10,7	15,5
2	175,3	62,6	33,7	30,5
4	422,8	117,9	77,6	56,7
6	680,2	158,8	89,4	85,7
12	1302,1	288,0	62,1	142,2
24	2270,2	532,2	275,4	219,2

*média dos resultados para n=3

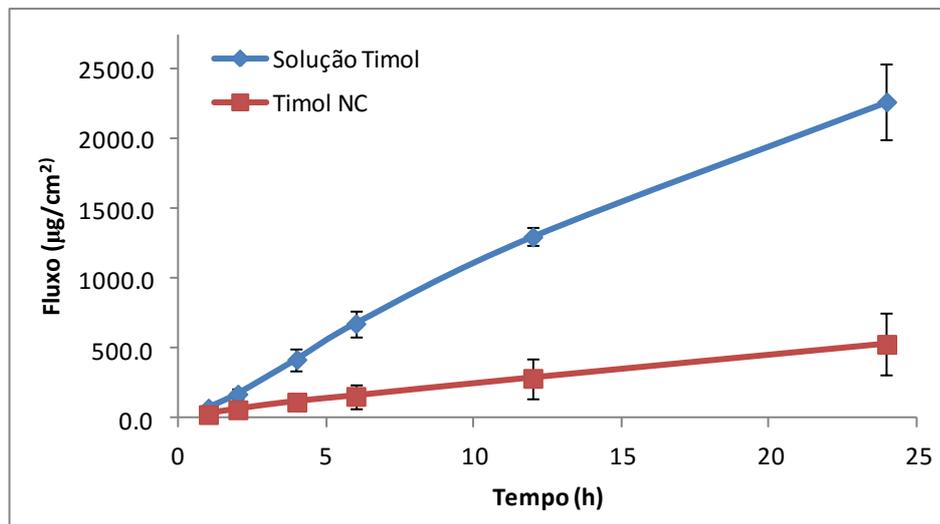
Para a comparação das formulações em um determinado tempo, seria interessante através dos valores de D (coeficiente de difusão) e K (coeficiente de partição) destas formulações, porém não foi possível a determinação desses valores. Contudo, para essa comparação e valores, é possível associar tais variáveis e determinar o coeficiente de permeabilidade (P) a partir dos resultados de fluxo (J) com base na primeira e segunda Lei de Fick como demonstrado a seguir (Equação 13).

$$\frac{dM}{A} = J = \frac{DKC_D}{h_B} dt \quad (\text{Eq. 13 a})$$

$$P = DK = \alpha \frac{h_B}{C_D} \quad (\text{Eq. 13 b})$$

Onde: M é a massa permeada, em μg ; t é o tempo, em hora; D é o coeficiente de difusão efetivo do fármaco através da barreira (neste caso membrana de diálise), K é o coeficiente de partição do fármaco entre a barreira e a formulação; h_B é a espessura da barreira, em cm ; A é a área efetiva de permeação, em cm^2 ; C_D é a concentração de fármaco no compartimento doador; C_R é a concentração de fármaco no compartimento receptor.

Figura 12 - Fluxo em função do tempo para liberação do timol em solução e em NC através de membrana de diálise.



A Eq. 13 permite que seja encontrado o valor do coeficiente de permeabilidade (P) para as formulações utilizando o coeficiente angular obtido pelo gráfico de fluxo em função do tempo, da espessura da membrana e da concentração no compartimento doador. A Tabela 18 apresenta os resultados do timol através de membrana de diálise obtidos com o emprego da Eq. 13, tornando possível a comparação entre as formulações. É possível observar que a solução etanólica de timol apresentou P , em média, três vezes maior que o timol nanoencapsulado, com valores de $1,40 \times 10^{-05}$ e $4,56 \times 10^{-06} \text{ cm}^2/\text{h}$, respectivamente. Pode-se relacionar a diferença no perfil de liberação das duas formulações ao controle exercido pelas nanocápsulas sobre a liberação de ativo. O timol quantificado no compartimento doador para a formulação de timol em NC provavelmente trata-se da forma não associada às

nanoparticulas que, de acordo com os resultados da eficiência de encapsulação, é de aproximadamente 1,5% do total de ativo na formulação de nanocápsulas. Pode-se inferir que essa quantidade de timol não associado foi mantida pelas NC, liberando gradativamente timol para o meio aquoso, assim houve timol suficiente para ser liberado ao compartimento receptor durante todo o experimento. Desta forma, não foi observado ponto de inflexão na curva de liberação da nanocápsula, ou seja, a reserva de timol disponível foi mantida e não permitiu que houvesse uma mudança no equilíbrio da difusão.

Tabela 18 - Valores do coeficiente de permeabilidade no estudo da liberação das formulações de timol.

	Timol	NCT
	$1,51 \times 10^{-05}$	$2,56 \times 10^{-06}$
P (cm²/h)	$1,44 \times 10^{-05}$	$4,63 \times 10^{-06}$
	$1,24 \times 10^{-05}$	$6,48 \times 10^{-06}$
Média	$1,40 \times 10^{-05}$	$4,56 \times 10^{-06}$
DP	$1,44 \times 10^{-06}$	$1,96 \times 10^{-06}$
DPR (%)	10,3%	43,1%

A cinética de liberação de um fármaco pode ser definida como mono ou biexponencial. A Tabela 18 apresenta os valores dos parâmetros para os modelos mono e biexponencial obtidos a partir da modelagem dos resultados da liberação da solução de timol e das NC. Os valores de r^2 próximos a 1 indicam excelente ajuste dos dados aos modelos mono e biexponencial. O Critério de Seleção de Modelo (MSC) é uma medida normalizada que relaciona o coeficiente de determinação e o número de parâmetros empregados para ajustar o modelo. Quando se comparam dois modelos com número diferente de parâmetros descritivos aquele com maior valor de MSC deve ser escolhido por maximizar a informação contida no modelo (MICROMATH, 2015). Assim, ambas as formulações foram mais bem descritas pelo modelo cinético de liberação monoexponencial. Este resultado demonstra que se verificou somente uma constante de liberação, indicando que a liberação do timol a partir das NC foi relativamente rápida em relação a sua difusão através da membrana de acetato de celulose, ou seja, a passagem pela membrana foi o passo limitante da liberação e a concentração livre de timol foi mantida aproximadamente constante na formulação devido à rápida liberação do fármaco a partir das NC.

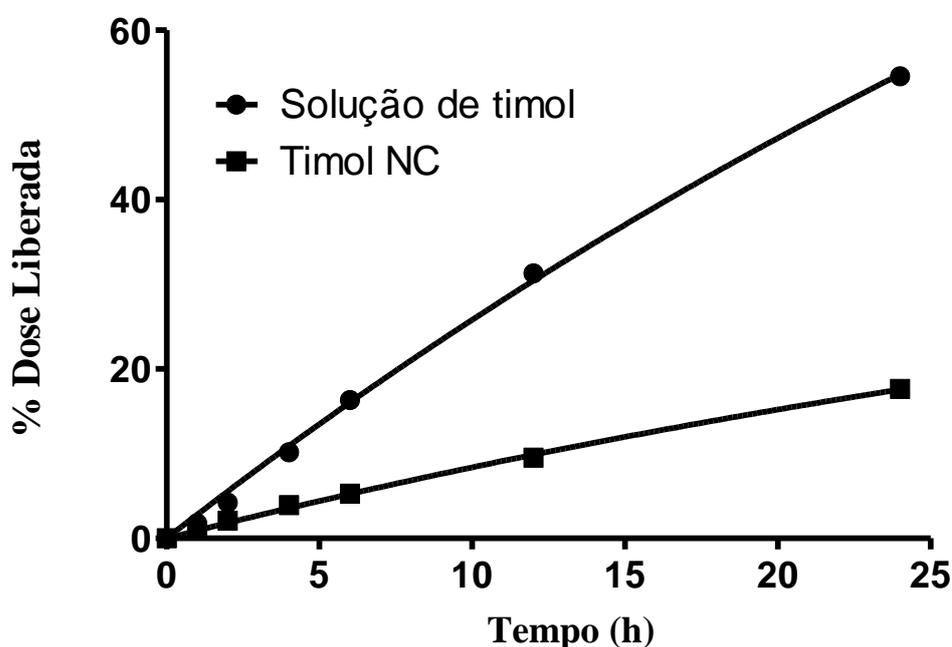
Tabela 19 - Resultados da análise da cinética de liberação do timol pelos modelos mono e biexponencial.

	Monoexponencial		Biexponencial	
	Timol	NCT	Timol	NCT
A	152,79	44,72	107,05	24,23
K ou K₁	54,04	48,09	67	43,39
B			52,28	13,07
K₂			42,48	30,97
r²	0,99902	0,99936	0,99902	0,99904
Erro Padrão	1,029	0,269	1,459	0,466
MSC	5,496	5,832	4,825	4,761

A Figura 13 apresenta os resultados da liberação ajustados ao modelo monoexponencial e se verifica maior liberação de timol a partir da solução do que das NC. Pode-se afirmar que houve controle da liberação do fármaco pela nanocápsula, chegando a no máximo 17,6% da dose liberada em 24 horas de ensaio. Já a solução etanólica de timol teve um perfil de liberação maior, chegando a 53,8% da dose liberada em 24h. Esse controle na liberação por parte do nanossistema pode ter impacto na atividade biológica do produto, podendo ser relacionado à atividade biológica que, no caso deste trabalho, é a repelência contra *Ae. aegypti*. Dependendo do impacto que esse controle da liberação tenha sobre o efeito desejado do produto, possa indicar a necessidade de uma otimização do produto.

A lei das potências é uma equação simples e compreensiva, proposta por Korsmeyer e colaboradores (1983), que descreve a liberação de fármacos por sistemas poliméricos (Eq. 13) (SIEPMANN & PEPPAS, 2001; COSTA & LOBO, 2001). A Tabela 20 resume os resultados obtidos da modelagem, com auxílio do programa Scientist[®], dos resultados de liberação do timol NC através da membrana de acetato de celulose. A solução de timol apresentou valor de n de 0,907 com intervalo de confiança de 95% (0,801-1,006) que engloba o valor 1,00. Como se verifica facilmente, quando n é igual a unidade a Eq. 16 descreve modelo cinético de ordem zero, quando a quantidade liberada de fármaco independe da concentração. Como a concentração de timol livre na solução é extremamente alta (> 10 mg/mL) e varia pouco nas 24 h do ensaio, pode-se assumir que a liberação do timol a partir da solução etanólica segue modelo de ordem zero, ou seja, a mesma quantidade de fármaco por unidade de área permeia a cada intervalo de tempo.

Figura 13 - Ajuste do modelo monoexponencial aos resultados da liberação do timol através de membrana de acetato de celulose.



O mecanismo de liberação do timol NC pode ser classificado como "Case II-transport", pois o n calculado foi de 0,866 (0.838-0.894), muito próximo ao estabelecido para esferas ($n = 0,85$ descrito por SIEPMANN, PEPPAS, 2001) que apresentam o referido mecanismo. No mecanismo "case II-transport" há uma redução da temperatura de transição vítrea do polímero, devido a presença de água que age como plastificante, e um aumento da mobilidade e do volume de expansão do polímero de revestimento da NC permitindo que o fármaco seja liberado (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

Tabela 20 - Resultados da modelagem da liberação da solução de timol e timol NC através de membrana de acetato de celulose.

Parâmetro	Solução de timol	Timol NC
K (IC _{95%})	3,096 (2,201-3,999)	1,119 (1,028-1,210)
n (IC _{95%})	0,907 (0,801-1,006)	0,866 (0,838-0,894)
r^2	0,9980	0,9998

Onde IC_{95%} é o intervalo de confiança de 95%.

A validação da extração do ativo foi uma etapa necessária para assegurar a inexistência de interferências dos constituintes da membrana biológica na detecção e quantificação de timol empregando o método (CLAE-DAD) desenvolvido e validado no presente estudo.

A

Figura 14 apresenta os cromatogramas da extração realizada com a pele de orelha de porco isoladamente e da pele adicionada de timol. Não foi verificada a presença de pico no tempo de retenção do timol no cromatograma da pele de orelha de porco demonstrando que o método é específico. Ainda na

Figura 14 podem ser observados o cromatograma das NCT, com detecção do monoterpeneo (Tr: 8,1 min), e avaliação da pureza do pico do timol. Nesse ensaio o ângulo de pureza apresentou valor de 0,323, menor que $2,5^\circ$, e a curva "threshold" não intercepta a curva de pureza, comprovando assim a inexistência de impurezas no pico do timol, o que ratifica a especificidade do método.

Para a análise do grau de recuperação do processo de extração do timol a partir da pele da orelha do porco, foi realizado um estudo comparativo utilizando dois solventes extratores, metanol e etanol a 40% em água. Os resultados obtidos nesse estudo, estão relacionados na Tabela 21, onde pode ser observado que a extração do timol da pele da orelha do porco com metanol produziu um percentual de recuperação média inferior (71,4 %; DPR: 11 %) em relação ao EtOH a 40% em água (90,9 %; DPR: 6,3 %).

Figura 14 - Cromatogramas (CLAE-DAD) em 276 nm. (a) Extrato da pele de orelha de porco na ausência (a) e na presença do timol (b).

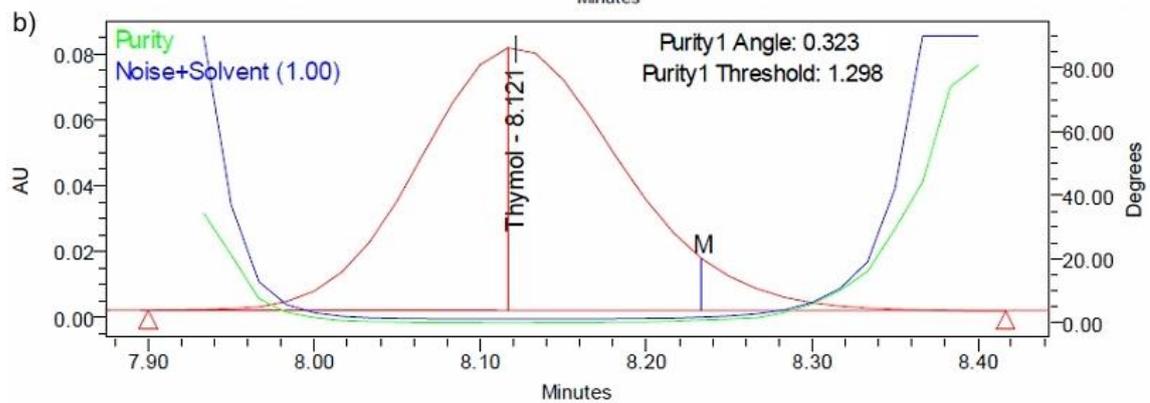
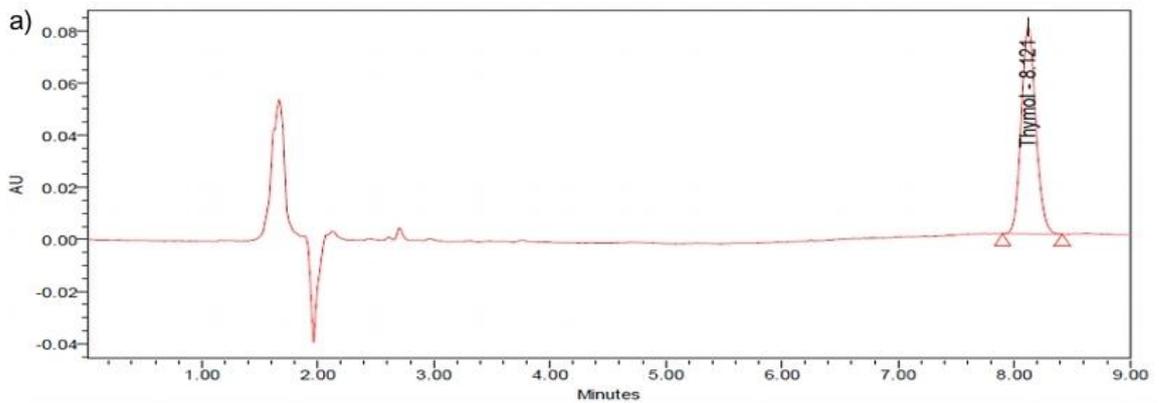
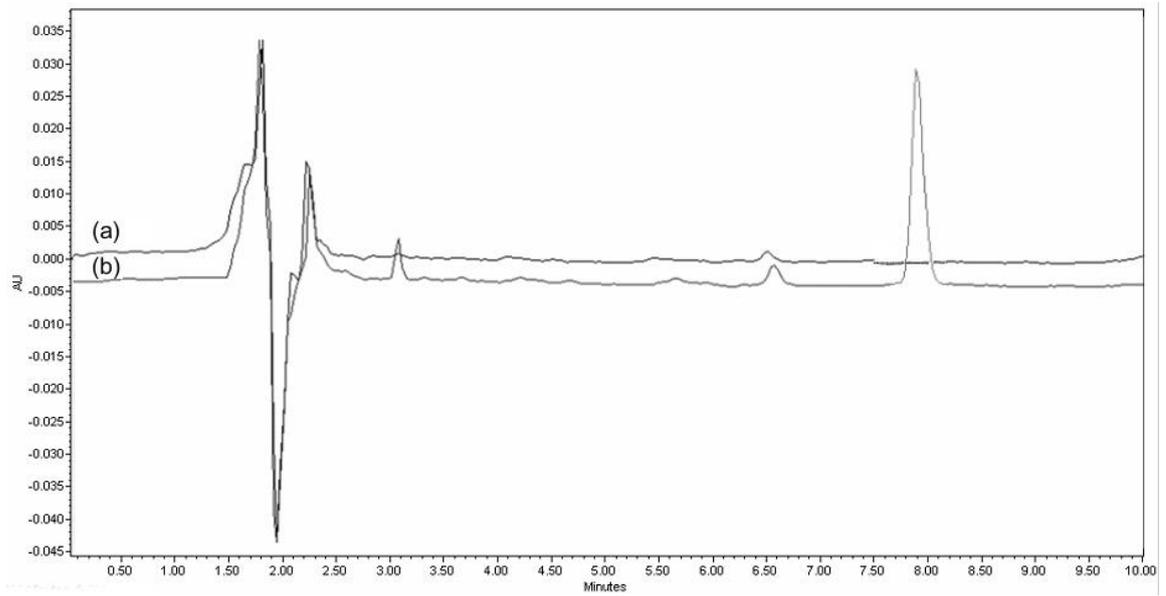


Tabela 21 - Avaliação da recuperação do timol em extrato da pele de orelha de porco.

Etanol 40%			Metanol		
m_{add} (μg)	$m_{\text{recuperada}}$ (μg)	Recuperação	m_{add} (μg)	$m_{\text{recuperada}}$ (μg)	Recuperação
363,00	367,81	101,3%	363,00	244,53	67,4%
363,00	338,44	93,2%	363,00	258,95	71,3%
363,00	300,12	82,7%	363,00	209,17	57,6%
72,60	70,03	96,5%	72,60	52,07	71,7%
72,60	66,73	91,9%	72,60	56,43	77,7%
72,60	64,50	88,8%	72,60	60,04	82,7%
14,52	12,66	87,2%	14,52	11,51	79,3%
14,52	12,39	85,3%	14,52	10,27	70,7%
14,52	13,25	91,2%	14,52	9,27	63,8%
Média (%)		90,9%	Média (%)		71,4%
DPR (%)		6,3%	DPR (%)		11,0%

6.6 Permeação e retenção cutânea do timol livre e encapsulado *in vitro*

Considerando a via de administração pretendida para as NCT, ou seja, tópica, os ensaios de permeação e retenção cutânea têm um papel importante por propiciarem informações sobre o comportamento do timol livre e encapsulado com a pele animal. Nesse sentido destaca-se que seleção da pele do porco albino foi selecionada por suas similaridades com a pele humana (OECD/428, 2004).

Nas Tabela 22 e Tabela 23 estão descritos os resultados dos ensaios de permeação e retenção cutânea, respectivamente do timol livre ou encapsulado obtidos com 24h de exposição da pele aos produtos. Na Tabela 22 pode ser observado que a quantidade de timol livre permeada foi cerca de 5 vezes superior em relação ao timol encapsulado. Esse resultado sugere que a afinidade relativa do timol à pele é aumentada na formulação das NC, o que pode ser considerado positivo considerando a aplicação tópica das NCT como repelente, portanto sua retenção na pele, é desejada.

Tabela 22 - Quantidade de timol permeado na pele de orelha de porco determinada com auxílio da célula de Franz.

Parâmetro	Timol	Timol em NC
Massa Permeada Total ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	2624 \pm 1,222	505 \pm 53
Dose (μg)	9840	9810
Dose Permeada (%)	26,7	5,1

Os resultados representam a média \pm DP de 4 a 6 experimentos.

A Tabela 23 mostra que a quantidade de timol livre retido no estrato córneo foi muito inferior ao encontrado na epiderme+derme para as duas formulações. Tal resultado pode ser relacionado pelo menos em parte à menor espessura e massa do estrato córneo em relação à epiderme+derme. No total (estrato córneo e epiderme+derme), a solução de timol apresentou 7,2 vezes mais timol acumulado do que a preparação de NCT, com médias de 318,3 e 44,3 μg , respectivamente.

Diante dos resultados obtidos, em linhas gerais a menor permeação do timol das NC na pele animal, o mantém no seu sítio de ação e reduz conseqüentemente sua absorção sistêmica, o que constitui algo positivo, considerando a segurança relativa *in vivo* e *in vitro* desse monoterpene (MEDEIROS *et al.* 2011). Corroborando com o presente estudo, Cal e colaboradores (2006) observaram que alguns terpenos, como α -pineno, β -pineno e o eucaliptol tendem a acumular-se na pele humana *in vitro*. Ainda, considerando os terpenos tanto cíclicos quanto acíclicos, foi observado melhor penetração na pele para os derivados oxigenados – álcool e óxidos, em relação aos ésteres e hidrocarbonetos (CAL *et al.*, 2003).

Tabela 23 - Avaliação da retenção cutânea do timol em pele de orelha de porco determinado por CLAE-DAD.

Parte da pele	Timol ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Timol em NC ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Razão
Estrato córneo	15,3 \pm 5,3	5,3 \pm 2,6	2,9
Epiderme+ Derme	302,9 \pm 95,5	39,1 \pm 8,8	7,8
Total	318,3 \pm 100,5	44,3 \pm 11,3	7,2 ^c

Os resultados representam a média \pm DP de 4 a 5 experimentos.

6.7 Avaliação da Citotoxicidade do timol livre e encapsulado em queratinócitos

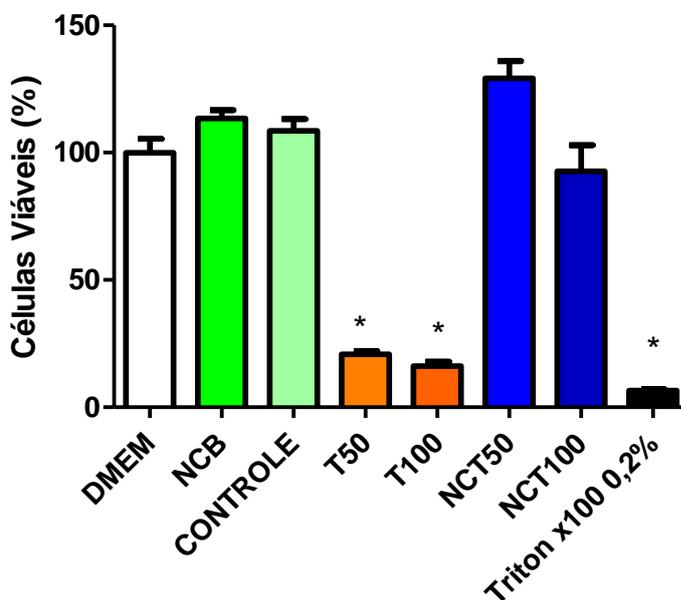
Os efeitos do timol livre e encapsulado sobre a viabilidade de queratinócitos humano (linhagem HaCat) estão representados na Figura 15. Inicialmente pode ser observado que tanto a nanocápsula branca (NCB) quanto o veículo das drogas testes (Timol e NCT) não interferiram significativamente na viabilidade celular em relação ao grupo DMEM (meio de cultura, células não tratadas). Por outro lado, a adição ao meio de concentrações crescentes de timol (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu significativamente o percentual de células viáveis ($20,8 \pm 1,3$ e $16,1 \pm 1,8$ %, respectivamente) em relação ao controle ($108,5 \pm 4,6$ %). As NCT (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), por sua vez, não interferiram significativamente na viabilidade celular em relação ao controle ou NCB.

O teste do MTT constitui uma ferramenta experimental muito útil na avaliação da citotoxicidade de novos produtos bioativos. Esse ensaio baseia-se no fato de o sal de cor amarela ser reduzido - principalmente por enzimas mitocondriais - a um sal de formazan, de cor roxa, sendo a intensidade desta cor proporcional a atividade metabólica da célula (MOSMANN, 1983; VERMA *et al.*, 2010). Trata-se de um método amplamente utilizado na avaliação *in vitro* da viabilidade ou atividade metabólica de cultura de células (SIEUWERTS *et al.*, 1995), seja de mamíferos ou de protozoários, como promastigotas (BERG *et al.*, 1994) e amastigotas do gênero *Leishmania* (SERENO & LEMESRE, 1997).

No presente estudo, o timol apresentou toxicidade significativa em cultura de queratinócitos determinada pelo teste do MTT, porém o encapsulamento desse terpeno foi capaz de prevenir essa toxicidade. A toxicidade observada para o timol sob a forma livre foi corroborada por estudo realizado por Medeiros e colaboradores (2011), que demonstraram a citotoxicidade de timol em macrófagos.

A ausência de toxicidade das NCT, foi resultado importante, um indicativo que esse produto parece ser seguro. Dessa forma, diante dos resultados obtidos o estudo prosseguiu com a avaliação da eficácia repelente de inseto (*Aedes aegypti*) das NCT em humano.

Figura 15 - Avaliação da toxicidade do timol livre e encapsulado em queratinócitos (linhagem HaCat) através do teste do MTT.



Queratinócitos (5×10^5 cél/mL) foram incubados com timol (T), nanocápsula de timol (NCT) ($\mu\text{g/mL}$), DMEM (meio de cultura/células não tratadas), NCB (nanocápsula branca), DMSO 1% (veículo/grupo controle) ou Triton x100, e 24 horas depois foi avaliada a viabilidade celular. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M, e representam a porcentagem de viabilidade celular, calculada em relação ao DMEM (100 % de viabilidade). *= $p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

6.8 Avaliação do potencial repelente das NCT ao mosquito *Ae. aegypti* em humano

Na Tabela 24 e Figura 16 podem ser observados os resultados obtidos na avaliação do potencial repelente das NCT ao mosquito *Ae. aegypti* em humano. O estudo piloto envolveu três voluntários que após o uso tópico das NCT a 1% ($500 \mu\text{L}$) apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de pousos/picadas do mosquito nos períodos de 60 e 180 min após a aplicação das NCT $1,3 \pm 0,33$ e $2,3 \pm 0,33^*$, respectivamente, em relação ao controle $4 \pm 0,57$ e $3,6 \pm 0,33$, correspondendo a um percentual de repelência da ordem de 67 e 33 %, respectivamente. Não foi observada uma redução significativa do número de pousos/picadas do mosquito aos 120 min após a aplicação das NCT $1 \pm 0,57$ em relação ao controle $3 \pm 0,57$, embora o percentual de repelência determinado tenha sido de 66 %. Ademais, a avaliação realizada no período de 5 min após a aplicação das NCT mostrou

grande variabilidade entre os voluntários quanto ao percentual repelente (min: 0%; máx.: 100 %). Isso ocorre, mesmo que no presente estudo cada voluntário tenha funcionado como seu próprio controle, o que previne eventuais diferenças individuais quanto a atração do mosquito a cada voluntário (YAP *et al.*, 1998).

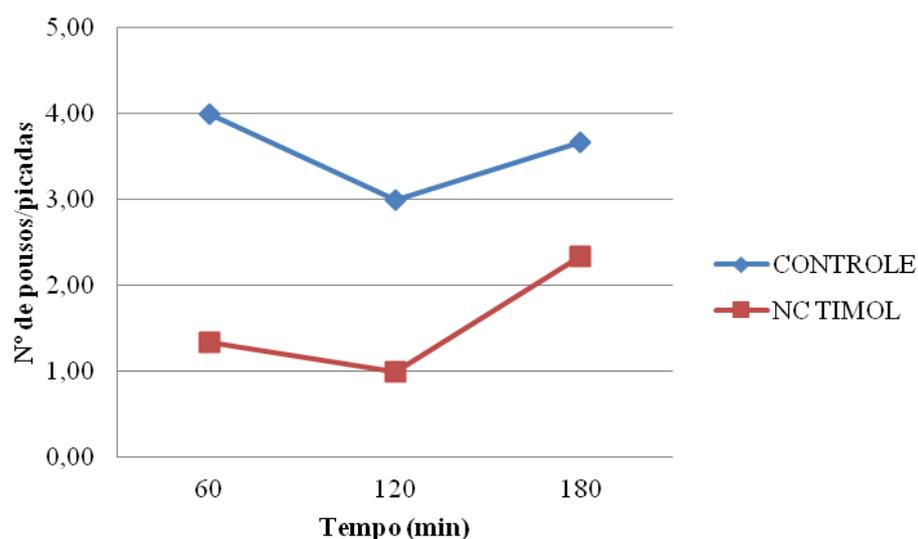
Diante dos resultados obtidos, as NCT mostraram ação repelente ao mosquito *Ae. aegypti*, que foi corroborada por estudo anterior (SENA, 2006) realizado em ratos. Nesse estudo, tanto a loção quanto a vela à base do óleo essencial das folhas de *L. sidoides* (OELS, 10%), que tem como um dos terpenos majoritários o timol (LEAL *et al.*, 2003), apresentaram potencial repelente ao mosquito *Ae. aegypti*. Novelino *et al.* (2007) também demonstraram a ação repelente do timol e de outras moléculas sobre *Boophilus microplus*.

Tabela 24 - Avaliação do potencial repelente das NCT em humano.

GRUPOS	Nº de pousos/picadas			% repelência		
	60 min	120 min	180 min	60 min	120 min	180 min
Controle	4 ± 0,57	3 ± 0,57	3,6 ± 0,33	-	-	-
NCT	1,3 ± 0,33*	1 ± 0,57	2,3 ± 0,33*	67,5	66,6	36,1

Os resultados representam a média ± EPM (n= 3). *= $p < 0,05$ (teste “t” Student).

Figura 16 - da avaliação do potencial repelente das NCT em humano.



7. CONCLUSÕES

O potencial repelente do timol faz oportuna a realização de estudos para obtenção de um produto otimizado com ação repelente prolongada (CARVALHO *et al.*, 2003). Por outro lado a instabilidade e a toxicidade do ativo faz necessária a utilização de tecnologias que ajudem a minimizar estes efeitos. A nanotecnologia é uma alternativa para viabilizar a liberação controlada de ativos, além de minimizar problemas de perda/degradação de ativo e toxicidade. Diante dos resultados expostos nesse estudo pode-se concluir:

Foi desenvolvido e validado método analítico (CLAE - DAD) para quantificação do timol na NCT e ensaios do estudo, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto;

Foi possível obter nanocápsulas de timol com tamanho médio de $146,8 \pm 1,3$ nm., distribuição homogênea, baixo índice de polidispersividade e aparentemente estável durante os 90 dias de estudo, mostrando porém uma diminuição inicial (30 dias) no teor de ativo, possivelmente pela perda do timol por evaporação.

No ensaio de liberação determinou-se que o coeficiente de permeação P do timol em solução etanólica foi em média 3 vezes maior que o da suspensão de nanocápsulas. A solução etanólica de timol segue modelo de ordem zero e as nanocápsulas de "Case II-transport". As NCT foram capazes de controlar a liberação do timol por 24 h;

No ensaio de MTT o timol apresentou citotoxicidade relativa em queratinócitos humano, sendo minimizada no fármaco nanoencapsulado, sugerindo uma proteção pelo nanosistema.

É necessária a continuação dos estudos no que tange à atividade *in vivo*, sendo que o teste de repelência em humanos servirá de parâmetro para estabelecer a quantidade necessária para uma efetiva proteção contra o mosquito *Ae. aegypti*. Além disso, faz-se importante a avaliação da irritabilidade dérmica com a finalidade de comprovar a segurança e eficácia do produto desenvolvido.

8. REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G, FESSI, H., A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol):Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 309 p. 178–188, 2006.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 9 ed., 2011.
- ALLEN JR., LOYD V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos/ LOYD V. ALLEN JR., NICHOLAS G. POPOVICH, HOWARD C ANSEL; tradução Elenara Lemos Senna, 8 ed., Porto Alegre, Artmed, 2007.
- ALONSO, M. J. **Nanoparticulate drug carrier technology**. In: COHEN, S. BERNSTEIN, H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. New York: Marcel Dekker. Cap. 7, p. 203-242, 1996.
- ALVES, M. P.; SCARRONE A. L.; SANTOS M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º ed., Porto Alegre: Artmed, p.677, p.115, 2005.
- BABY, A. R., HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A., SARRUF, F. D., TAVANTE-JÚNIOR, C. R., DE OLIVEIRA PINTO, C. A. S., ZAGUE, V., VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Rev. Food Chem. Toxicol.** 46, 446–475, 2008.
- BARBERO A. M.; FRASCH, H. F.; Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro** v. 23 p. 1–13, 2009.
- BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: Percutaneous absorption**. England: Marcel Dekker, INC, p.1-233, 351-407, 1983.
- BERG, K., ZHAI, L., CHEN, M., KHARAZMI, A., & OWEN, T. C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. **Parasitology research**, v. 80, n. 3, p. 235-239, 1994.
- BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 325, p. 124-131, 2006.

BOTELHO, M. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V. S. and BRITO, G. A. C.; Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, cavacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J. Med. Biol. Res.** V. 40, p. 349-356, 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 211, DE 14 DE JULHO DE 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Utilização do DEET em preparações de repelentes para insetos. **Parecer Técnico Nº 2, de 11 de dezembro de 2006. Disponível em:** <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_deet.htm> Acesso em: 10/10/2014.

BROWN & HEBERT. Insect repellents: An overview. **J Am Acad Dermatol**; v. 36; p. 243-9.), 1997

CAL, K., KUPIEC, K., Sznitowska, M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. *Journal of Dermatological Science. Ireland.* v. 41, p. 137—142, 2006.

CÂMARA F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G; CÂMARA D.C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40 (2): p192-196, mar-abr, 2007.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers **J. Pharm. Sci.**, v. 8,5 p. 530, 1996

CAREY, F.A. **Química Orgânica**, 7. ed. São Paulo: Editora Artmed, p. 1100-1170, 2008.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V.M.M. ; CRAVEIRO, A. ; BANTIM, M. M. B. ; RABELO, E. F. . Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 04, p. 569-571, 2003.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004

CDC – CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue. USA. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>> Acesso em: 03 abr. 2015.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G.; OBERG, C.J. Screening for inhibitory activity of essential oils selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n.5, p.639-649, 2000.

CHOU, J. T; ROSSIGNOL P. A.; AYRES J. W. Evaluation of Commercial Insect Repellents on Human Skin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, 34(6):625-630, 1997.

CONTRI, R. V.; FIEL, L. A.; POHLMANN, S. A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and *in Vitro* Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration. *In*: BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, S. A. R. (Ed.) *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. Heidelberg. Springer-Verlag. 2011. p. 6-36

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** . v. 13; p. 123–133, 2001

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; ASSUNÇÃO, J.C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham) Verbanaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12. supl. p. 66-67, 2002. São Paulo, Andrei editora, 2002.

DAMBOLENA, J.S; LÓPEZ, A.G.; CÁNEPAC, M.C.; THEUMERC, M.G.; ZYGADLOA, J.A.; RUBINSTEIN H.R.. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. **Toxicon**. v 51, p. 37-44, 2008.

DEKKER, T.; GEIER, M.; CARDÉ, R. T. Carbon dioxide instantly sensitizes yellow fever mosquitoes to human skin odours. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, 208:.2963-2972, 2005.

DEVISSAGUET, J.P., FESSI, H., PUISIEUX, F.,. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules. **US Patent 5049322**, 17 September. 1991

DIEMBECK W., BECK H, BENECH-KIEFFER F, COURTELLEMONT P, DUPUIS J, LOVELL W, PAYE M, SPENGLER J, STEILING W, Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205. (1999).

DE ANTONIO, M. E. C. O. Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas. 2007. Dissertação. Universidade Federal do Paraná - UFPR. Curitiba. 2007

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. 1994 . Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 69: 25–28

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical analisys**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

DO AMARAL, L. A química. São Paulo: Edições Loyola, 1995.

ERICKSON, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1. p.32-51, 2009. DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 24 p. 755–767, 2001

ERMER J & PLOSS HJ. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 37, n. 5, p. 859–870. 2005;

ERMER, J. and MB. Miller, J. H. (eds) Front Matter, in Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. doi: 10.1002/3527604685.fmatter. 2005

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013. . (European Treaty Series, n.50).

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Especial Dengue. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=373&sid=12>> Acesso em: 18/11/2011

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Especial Dengue. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/pesquisadora-estuda-estrategia-inovadora-na-luta-contradengue>> Acesso em: 03/04/2015

FIP Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products. **Pharm Ind**, v. 43, p. 334-343, 1981.

FONSECA, YRIS MARIA, Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea. Ribeirão Preto, 2007.

FLATEN G. E.; A, PALAC, Z.; ENGESLAND, A.; FILIPOVIC´-GRC´IC´ B. J.; VANIC´, Z.; B,1, ŠKALKO-BASNET, N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 75, p. 10–24, 2015.

FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician’s guide. **Annals of Internal Medicine**, 128: 931-940, 1998.

FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites **The New England journal of medicine**, Massachusetts, v. 347: 13-18, 2002.

FRANZ, T.M. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology** v. 99 p. 2507–2515, 2008.

GIRÃO, V.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; MORAIS, S.M.; SEQUEIRA, J.L.; GIOSO, M.A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 59, p. 95-102, 2003

GUBLER, D. J.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11(3), p. 480 – 496, (1998)

GUTERRES, S.S., FESSI, H. , BARRATT, G. , DEVISSAGUET, J.-P. , PUISIEUX, F. . Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 113, n. 1, 2, p. 57–63. 1995

HADGRAFT, J. Skin deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.58, n.2, p.291-299, 2005.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int. J. Pharmaceutic.**, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE B.G.M.; B. . MASSART, D.L. Guidance for robustness:ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 24, p. 723–753, 2001.

HOSMER, J.; REED, R.; VITÓRIA, M.; BENTLEY, L.B.; NORNOO, A.; LOPES, L.B. Microemulsions Containing Medium-Chain Glycerides as Transdermal Delivery Systems for Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. **American Association of Pharmaceutical Scientists: Pharmaceutical Sciences Technology**, v. 10, n. 2, p. 589-596, 2009.

HUND, E.; HEYDEN; Y. V.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 30 (2002) 1197_/1206

ICH, Topic Q2 (R1). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. 2014.

International Standard ISO13321 Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy, International Organisation for Standardisation (ISO) 1996.

JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. *Histologia Básica*. Tradução da *Histologia Básica*, 8° Ed. Editora Guanabara Koogan – Rio de Janeiro, 1995.

KATZ T. M.; MILLER J H., HEBERT A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **J am acad dermatol.**v. 58 p. 865 - 871. 2008

KEIPER, A. The nanotechnology revolution. **New Atlantis Spring.** v. 17, p. 34, 2003.

KHOEE, S., & YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2392-2399, 2009.

KORSMEYER, R.W., GURNY, R., DOELKER, E.M., BURI, P., PEPPAS, N.A., Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.** v. 15, p. 25–35. 1983

KUNLE, O.; OKOGUM, L.; EGAMAMA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, M. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia mutiflora* leaf extract . **Phytomedicine.** v. 10, p. 59-61, 2003.

LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; H. FINKEL, P.P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28 p. 359–370, 2006.

LEAL, L.K .A.M.; OLIVEIRA, V.M.; ARARUNA, S.M.; MIRANDA, M.C.C.; OLIVEIRA, F.M.A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrimpimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 13, supl., p. 09-11, 2003.

LEAL, L. KALYNE A. M. ; Leal, L. Kalyne A. M. ; LOUCHARD, B. O.; LOPES, A. A. ; SILVA, A. R. A. . Preparações farmacêuticas de uso tópico contendo nanosistemas a base de óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim pimenta) ou timol, indicadas para o tratamento de doenças inflamatórias. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150087322, data de depósito: 17/04/2015. Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LI, K. -K, YIN, SHOU-WEI; YANG, X-Q.; TANG, C.-H.; WEI, Z-H. Fabrication and Characterization of Novel Antimicrobial Films Derived from Thymol-Loaded Zein–Sodium Caseinate (SC) Nanoparticles. **J. Agric. Food Chem.** v. 60, p. 11592–11600, 2012.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An. Bras. Dermatol.**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de Abreu; Instituto Plantarum de Estudos da Flora. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MACCARI, F. L. R. Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* e estabilidade de emulsões contendo (-)- terpinen-4-ol. 2011. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus Araraquara . Araraquara, São Paulo. 2011.

MALVERN Instruments Ltd. Zeta Sizer Nano Series- User Manual. Reino Unido 2003, 2004

McARTHUR, M. A.; & Edelman, R. A Promising, Single-Dose, Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate. **Journal of Infectious Diseases Advance Access**. 22 de março de 2015

MEDEIROS, M. G. F., SILVA, A. C., CITÓ, A. M. G. L., BORGES, A. R., LIMA, S. G., LOPES, J. A. D., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**. v. 60, n. 3, p. 237–241. 2011

MELO, N. F. S.; ARAÚJO, D. R. A.; GRILLO, R.; MORAES, C. M.; MATOS¹, A. P.; PAULA¹, E.; ROSA, A. H.; Fraceto, L. F. Benzocaine-loaded polymeric nanocapsules: Study of the anesthetic activities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 101, n. 3, p. 1157–1165, 2012

Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., Inc.; 2001. α -Bisabolol; p. 212.

MICROMATH, disponível em:

https://www.micromath.com/products.php?p=scientist&m=statistical_analysis. Acesso em: 29/03/2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde – Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da dengue. **Balanço Dengue Semana Epidemiológica** até semana 12 de 2015

MIRON *et al.* HPLC-DAD for the determination of three different classes of antifungals: method characterization, statistical approach, and application to a permeation study. **Biomed. Chromatogr.** V. 28, p. 1728–1737, 2014.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACON, M.; BERGES, L.; GUZMAN, M.; Stability of cyclosporine-loaded poly-X-caprolactone nanoparticles **J. Microencapsulation**, V.14, p. 777, 1997.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v 385, p. 113–142, 2010.

MORAES, A. S.; ESTUDO DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS REPELENTES A PARTIR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham. OU TIMOL INDICADOS CONTRA O VETOR DA DENGUE. (Departamento de Farmácia) Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER-GOYMANN, [C.C.](#). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 58, n. 2, p. 343–356. 2004

NEVES, D. P.; SILVA, J. E. **Entomologia Médica: comportamento, captura, montagem**. COOPMED, 112p, 1989.

NES, W. D.; ZHOU, W. Terpenoids: HIGHER, 2001. In: **Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group**, Disponível em: <<http://www.els.net>> Acesso em: 8 set. 2014.

NIELSEN, J. B., NIELSEN, F. Topical use of tea tree oil reduces the dermal absorption of benzoic acid and methiocarb. **Archives of Dermatological Research**. v. 297, p. 395–402, 2006. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/pk13053xhw30u448/>. Data de acesso: 01/12/2014.

NOVELINO, A. M.; DAEMON, E.; SOARES, G. L. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 59, n. 3, p. 700-704, 2007.

OECD-ENVIRONMENT DIRECTORATE, JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY. Guidance for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment. n. 28, 05 mar, 2004.

PAGLIARA, A., REIST, M., GEINOZ, S., CARRUPT, P. A., TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, p. 1339-1357, 1999.

PAIM *et al.* Validation of UV Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Entacapone in Tablets Using Experimental Design of Plackett-Burman for Robustness Evaluation and Comparison with HPLC. **Analytical Letters**, v. 41, p. 571–581, 2008.

PANDEY; S. K.; UPADHYAY, S.; TRIPATHI, A. K.. Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. **Parasitol Res** v 105, p. 507–512. DOI 10.1007/s00436-009-1429-6 .2009

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data, **Appl. Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.

POLETTI, F. *et al.* Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. **Nanocosmetics and Nanomedicines**: Springer Berlin Heidelberg, 2011. cap. 3, p.49-68. ISBN 978-3-642-19791-8.

QUINTANAR, D., ALLÉMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E., 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 24, p.1113–1128.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 349p, 1992.

RIGG, P. C.; BARRY, B. W. Shed Snake Skin and Hairless Mouse Skin as Model Membranes for Human Skin During Permeation Studies. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 94. p. 235-240. 1990

ROBBERTS, J. S.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**, Waverly Company, 1996.

SANCHEZ, F. C., TOFT, J., VAN DEN BOGAERT, B., & MASSART, D. L. Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 79-85, 1996.

SANCO/222 - EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, rev. 7, 2004. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkd20_rev_en.pdf
Data de acesso:02/08/2015.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineol a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTOS, S. S., LORENZONI, A., FERREIRA, L. MATTIAZZI M. J., ADAMS, A. I. H., DENARDI, L. B. , ALVES S. H., SCHAFFAZICK, S. R. , L. C. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering** v. 33 p. 1389–1394; 2013.

SCCP/0970 - SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS – **Basic Criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients** , 2006.

SENA, V.C.S.; Avaliação da ação repelente do óleo de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) contra o mosquito *Aedes aegypti* L., 1762. 2006. 64f . (Departamento de Biologia) Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2006.

SERENO, D.; LEMESRE, J-L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitol Res** v. 83: p. 401-403(1997)

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineol a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

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

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics** v. 215 p. 51–56, 2001

SIEUWERTS, A. M., KLIJN, J. G., PETERS, H. A., & FOEKENS, J. A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, n. 11, p. 813-824, 1995.

SEO, K.A.; KIM, H.; KU, H.Y.; AHN, H.J.; PARK, S.J.; BAE, S.K.; SHIN, J. G.; LIU, K.H. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydro xylase activity. **Chemico-Biological Interactions**. v 174 p. 141 - 146. (2008).

SHABIR, G. A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v 987. p. 57–66, 2003.

SIEPMANN J., J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48; p. 139-157, 2001

SILVA, L. A. D. Penetração cutânea passiva e iontoforética de propionato de clobetasol incorporado em carreadores lipídicos nanoestruturados. 2013. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2013.

SILVEIRA, E. S. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de nanocápsulas de cinamato de metila: potencial anti-inflamatório. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará - UFC. Fortaleza, 2015.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 3. ed. Editora da universidade/ UFRGS/ UFSC, 2001.

SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, p.259-269, 2000.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Control. Release** 70, 1–20, 2001.

SUAREZ; A. M.; VERBEL; J. O. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. **Rev. costarric. salud pública**. v.22 n.1. p. 68-75. San José. 2013

SZENTANDRÁSSY, N; SZENTESI, P; JÁNOS MAGYAR, PÉTER P NÁNÁSI*; LÁSZLÓ CSERNOCH. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. **BMC Pharmacology**. 1471-2210/3/9

TAUIL, P. L.,. Controle de agravos à saúde: Consistência entre objetivos e medidas preventivas. Informativo Epidemiológico do SUS , v. 7, p. 55-58, 1998

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil, Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 18(3):867-871, mai-jun, 2002.

TAWATSIN, A; WRATTEN, S. D.; SCHOTT, R. R.;THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, Vol. 26, No. 1: 76-82, 2001.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M.M. BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.59 p. 491–500, 2005.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHOMPOOSRI, J.; SUWONKERD, W.; CHANSANG, U.; ASAVADACHANUKORN, P. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and DEET against mosquito vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno , v. 17, n. 3, p.190-195, 2001.

TOSCAN, Cristiane Menegotto. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. Dissertação (Mestre). UCS, 2010. 69 p. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010

TUETUN, B.; CHOOCHOTE, W.; KANJANAPOTHI, D.; RATTANACHANPICHAI, E.; CHAITHONG, U.,CHAIWONG, P.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P., RIYONG, D.; PITASAWAT, B. Comparative repellency of *A. graveolens* and commercial products. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 1190-1198 november, 2005.

ULTEE, A., GORRIS, L. G. & SMID, E. J Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 85, 211–218. . (1998).

VAN DE SANDT, J. J. M.; MEULING, W. J. A.; ELLIOTT, G. R.; CNUBBEN, N. H. P. ;* HAKKERT, B. C. *Toxicological*. Comparative *in Vitro–in Vivo* Percutaneous Absorption of the Pesticide Propoxur. **Toxicological sciences** v. 58, p.15–22, 2000.

VERMA A.; PRASAD, K. SINGH, A. K; NYATI, K K; GUPTA R. K.; PALIWA V. K.. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis **Journal of Microbiological Methods**. v. 81 p. 175–178, 2010.

VIEIRA, G. S. S. Distribuição geográfica da dengue e índice de Infestação de *Aedes Aegypti* em Uberlândia (MG), 2000 A 20021 **Caminhos de Geografia**, Rio de Janeiro, 11 (17) 107 - 122, 2006.

VODA, K., BOH, B., VRTACNIK, M., POHLEVEN, F. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. **Int. Biodeter. Biodegr.** 51, 51–59, 2003..

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. analytical method validation and quality assurance. **Trends in analytical chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity II Peak purity plot. Waters Corporation. Milford, USA. 508 478-2000. 1998

WATTANASATCHA, A., RENGPIPAT. S., WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 434 p. 360 – 365, 2012.

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

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DENGUE: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL, 2nd Edition, 1997.**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Collaboration For Development Of Pesticides For Public Health (GCDPP). **Repellents and Toxicants for Personal Protection** Position Paper By: Dr. D. R. Barnard. 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DENGUE: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL, 2009a.**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GUIDELINES FOR EFFICACY TESTING OF MOSQUITO REPELLENTS FOR HUMAN SKIN, 2009b.**

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mapa da dengue. Disponível em: < <http://www.healthmap.org/dengue/pt/> > Acesso em: 25/04/2015.

YAP, H. H., JAHANGIR, K., CHONG, A. S., ADANAN, C. R., CHONG, N. L., MALIK, Y. A., & ROHAIZAT, B. Field efficacy of a new repellent, KBR 3023, against *Aedes albopictus* (SKUSE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in a tropical environment. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 23, n. 1, p. 62-68, 1998.

ZAMPIERI, A. L. T. C., *Desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea da isoflavona genisteína em nanocápsulas poliméricas.* 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2009.

ZHU, J.; ZENG, X. Y.; LIU, T.; QIAN, K.; HAN, Y.; XUE, S.; TUCKER, B. S. G.; COATS, J.; ROWLEY, W.; ZHANG, A. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, 22(3): 515-522, 2006.

ZYGADLO, A.J., JULIANI, H.R. Bioactivity of essential oil components. **Curr. Top. Phytochem.** 3, 203–214 , 2000.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
REITORIA
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



Biblioteca universitária

Solicitação de Catalogação na Publicação			
<i>Preencher com letra legível</i> <i>Entrega no seu e-mail em até 03 dias úteis</i>			
Autor: Nome Completo	Anderson de Souza Moraes		
Título:	CARACTERIZAÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOCÁPSULAS DE TIMOL E AVALIAÇÃO DA PERMEÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE REPELENTE CONTRA Aedes Aegypti		
Sub-Título: (Se houver)	-		
Quantidade de folhas: (se impressão só frente) 90	Quantidade de páginas: (se impressão frente e verso)		
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	Cidade: Fortaleza		
Centro e Departamento: FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM/ DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA	Curso (denominação oficial): Mestrado em Ciências Farmaceuticas		
Ano da Defesa: 2015			
Ilustrações (assinalar): <input checked="" type="checkbox"/> Figuras (fotos, mapas, etc) <input type="checkbox"/> Gráficos <input checked="" type="checkbox"/> Tabelas <input type="checkbox"/> Quadros <input type="checkbox"/> Transparências			
Coloridas	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Natureza do trabalho	<input type="checkbox"/> Relatório <input type="checkbox"/> Projeto	<input type="checkbox"/> Monografia <input type="checkbox"/> Tese	<input checked="" type="checkbox"/> Dissertação
Orientador: (Nome Completo e titulação)	Profª. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.		
Co-orientador: Se houver (Nome completo e titulação)	Dr. Diogo dos Santos Miron		
Área de Concentração*: Farmácia Experimental e Tecnológica			
Material Anexo (Acompanha a obra, externo à obra)	<input type="checkbox"/> Mapas	<input type="checkbox"/> Folders	
	<input type="checkbox"/> CD-Rom	<input type="checkbox"/> Fotos	
	<input type="checkbox"/> Fitavideo	<input type="checkbox"/> Outros:	
	<input type="checkbox"/> Disquete		
Palavras-chave: (3 a 5 que não constem no título)	timol, nanocápsula, atividade repelente, citotoxicidade		
E-mail:	Anderson.moraes00@gmail.com		

OBS:

- Contar folhas/páginas a partir da folha de rosto;
- Favor anexar a este formulário a cópia do **trabalho no todo**;
- Enviar para o email da biblioteca que atende ao seu curso.