



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLOGICA EM MEDICAMENTOS

BIANCA OLIVEIRA LOUCHARD

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* CHAM.):
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

FORTALEZA
2016

BIANCA OLIVEIRA LOUCHARD

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* CHAM.):
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

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

Co-orientador: Dr. Ângelo Roncalli Alves e Silva

FORTALEZA

2016

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

xxxxx Louchard, Bianca Oliveira.

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham): caracterização e avaliação biológica / Bianca Oliveira Louchard – Fortaleza, 2015. 90 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Co-orientação: Ângelo Roncalli Alves e Silva.

1. *Lippia sidoides*. 2. Alecrim-pimenta. 3. Nanocápsulas. 4. Anti-inflamatório. I. Título.

CDD xxxxx

BIANCA OLIVEIRA LOUCHARD

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* CHAM.):
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

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

Co-orientador: Dr. Ângelo Roncalli Alves e Silva

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a.. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ângelo Roncalli Alves e Silva (Co-orientador)
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a. Dr^a. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Valter Andrade Neto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof^a. Dr^a. Nagila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Aos meus filhos
Pietra e Vincent
por serem a luz da minha vida,
dedico.*

5

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por que afinal de contas Ele é a grande finalidade da nossa existência

Agradeço a minha orientadora Prof. Kalyne, pelo acolhimento e pelo exemplo de força empenho, e luta para fazer pesquisa e gerar tantos frutos

Aos meus Pais Marilene Rodrigues de Oliveira e Luiz Gonzaga de Oliveira, pelo incentivo constante nessa minha caminhada

Ao meu marido Sergio, pela paciência, paciência e paciência e todo o carinho e companheirismo nas longas madrugadas de estudo

Agradeço imensamente ao Emanuel, Lyara, Larissa, Rayanne, Saul, Talisson, e Diogo, pela ajuda nos experimentos sem os quais este trabalho não seria possível. E a Talita, Taiana, Aline, Sandra, Moises, Ana Paula, Elizama, Anderson, Silésia, Luciana, Thiala, Jackie e a todos os meus colegas do CEFAC pelo companheirismo e descontração

Ao meu amigo e co-orientador Ângelo, pelas instruções estímulo e troca de ideias que muito contribuiu para o direcionamento e finalização desse trabalho,

As minhas amigas Karla e Amanda pelo apoio, estímulo e risadas vocês moram no meu coração!!

Ao meu vizinho irmão Luis, Denise e Cia, e aos queridos Vidas da Servos por Amor, por serem minha família aqui na terra do sol

Aos meus colegas do CTT de Homeopatia pelos momentos de descontração e pela torcida pela finalização da tese

Gostaria de agradecer também aos professores que contribuíram cedendo seus equipamentos e laboratórios, os quais foram de fundamental importância na realização deste trabalho: Prof. Nágila Ricardo Pontes, Prof. Pedro Alejandro Ayala, Prof. Gilvandete Santiago e Prof. Luciana Magalhaes Rebelo

A prof. Tamara pelo incentivo constante e pela participação na banca de qualificação

E a todos os funcionários, professores, e alunos da UFC pelo convívio, e especialmente a Jessica e ao Wilian da Pós-graduação, pela eficiência no trabalho e por estarem sempre prontos a ajudar com um sorriso aberto e franco no rosto

A prof. Marta Fonteneles e Prof. Romelia Pinheiro pelo cuidado e dedicação na condução do programa PPDITM

A CAPES pela bolsa e ao CNPq/Funcap pelo apoio financeiro através de Projeto

"Se você não está preparado para errar você nunca conseguirá fazer nada original"

Sir Ken Robinson

RESUMO

A espécie *Lippia sidoides* Cham., conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta aromática do nordeste brasileiro cujas pesquisas apontam promissoras atividades antimicrobiana e anti-inflamatória. Das folhas de *L. sidoides* extrai-se um óleo essencial constituído principalmente de timol, componente de pronunciada ação antimicrobiana, mas que pode apresentar toxicidade em doses elevadas. A veiculação de fármacos em forma de nanopartículas têm atraído grande interesse nos últimos anos, pois esses sistemas são capazes de conferir proteção a substância ativa, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo efeitos adversos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e realizar avaliação biológica de nanosistemas contendo óleo essencial de *L. sidoides* (OELS). O estudo incluiu caracterização da droga vegetal e derivado (óleo essencial), padronização analítica – CLAE-DAD e CG-MS (marcador: timol), desenvolvimento de nanocápsulas de *L. sidoides* (NCLS), estudo de estabilidade, e avaliação da citotoxicidade e das atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória tópica em camundongos. O teor de OELS extraído das folhas foi em torno de 4,6%, (compostos majoritários: timol 65%, o-cimeno .17% e e-cariofileno 4%). O método analítico por CLAE-DAD se mostrou específico, linear ($r = 0,996$), exato, preciso, e robusto de acordo com diretrizes da ANVISA. As NCLS (timol: $3,1 \pm 2,5$ mg/mL), apresentaram eficiência de encapsulação 92 %, diâmetro médio 190 nm, PDI 0,204 e potencial zeta -20 mV. No estudo de estabilidade não houve alterações expressivas dos parâmetros até 120 dias (25°C). Na avaliação antimicrobiana OELS e NCLS apresentaram CIM de 70 µg/mL. A avaliação da atividade anti-inflamatória demonstrou que o OELS e o timol dependendo da dose possui atividade pró ou anti-inflamatória. O nanosistema sem ativo mostrou efeito antiedematogênico, e dentre os nanosistemas investigados, NCLS e nanoemulsão/OELS, o último inibiu significativamente o edema de orelha induzido por TPA e reduziu a concentração de mieloperoxidase (MPO). O desenvolvimento e a padronização do nanosistema a base de *L. sidoides* mostrou características tecnológicas de interesse, extinguiu a toxicidade do OELS em neutrófilo humano mantendo o potencial antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório da planta.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*. Alecrim-pimenta. Óleo essencial. Nanopartículas, Anti-inflamatório. Antimicrobiano.

ABSTRACT

The species *Lippia sidoides* Cham., known as rosemary-peppermint, is an aromatic plant of northeastern Brazil whose research show promising antimicrobial activity and anti-inflammatory. From the leaves of *L. sidoides* extract an essential oil consisting mainly thymol, pronounced antimicrobial component, but it can present toxicity at high doses. The placement of drugs in nanoparticulate form have attracted great interest in recent years because these systems are able to confer protection active substance, increasing the therapeutic efficacy and reducing side effects. The aim of this study was to develop, characterize and perform nanosystems biological assessment containing essential oil of *L. sidoides* (OELS). The study included characterization of plant and drug derivative (essential oil), analytical standardization - HPLC-DAD and GC-MS (marker: thymol), development of nanocapsules *L. sidoides* (NCLS), stability studies, and evaluation of cytotoxicity and the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory topical. The OELS content extracted from the leaves was around 4.6% (major compounds: thymol 65%, o-cymene 17% and e-caryophyllene 4%). The analytical method by HPLC-DAD showed specific, linear ($r = 0.996$), accurate, precise and robust according to ANVISA guidelines. The NCLS (thymol: 3.1 ± 2.5 mg / mL) showed 92% encapsulation efficiency, average diameter 190nm, 0.204 PDI and zeta potential -20 mV. In the stability study there was no significant change of the parameters up to 120 days (25°C). In antimicrobial evaluation OELS and NCLS showed MIC 70 mg / mL. Assessment of anti-inflammatory activity demonstrated that OELS and thymol depending on the dose has pro-inflammatory or anti activity. The nanosystems no active showed antiedematogenic effect, and among the investigated nanosystems, NCLS and nanoemulsion / OELS, the latter significantly inhibited the ear edema induced by TPA and reduced the concentration of myeloperoxidase (MPO). The development and standardization of nanosystems the basis of *L. sidoides* showed technological features of interest, quenched toxicity OELS in maintaining human neutrophil antimicrobial potential antioxidant and anti-inflammatory plant.

Keywords: *Lippia sidoides*. Rosemary-pepper. Essential oil. Nanoparticles, Anti-inflammatory. Antimicrobial.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>atomic force microscopy</i> - microscopia de força atômica
ANOVA	análise de variância
ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
CBM	concentração bactericida mínima
CG	cromatografia gasosa
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	detector de arranjo de diodos
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSC	differential scanning calorimetry (Calorimetria exploratória Diferencial)
EM	espectrometria de massas
EROs	espécies reativas de oxigênio
FMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
IC50	<i>inhibitory concentration</i> (concentração que reduz o efeito em 50%)
LDH	lactato desidrogenase
Luc	luciferina
Lum	luminol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MPO	mieloperoxidase
MTT	sal reduzido de tetrazol à formazan púrpura
NCLS	nanocápsulas de óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.
NELS	nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.
OE	óxido de etileno
OELS	óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.
PACA	poliaquilcianoacrilatos

PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PKC	proteina quinase C
PLA	acido polilático
PLG	acido poliglicolico
PLGA	ácido poli(lático-co-glicolico)
PMA	acetato de forbol miristato
PMN	polimorfonucleares
PO	oxido de propileno
POE	polioxido de etileno
PPO	polioxido de propileno
QL	quimioluminescencia
Tg	temperatura de transicao vítrea
TIM	timol
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-acetato
UV/VIS	ultra violeta / visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B)	28
Figura 2 – Estrutura química do PLGA e seus monômero.....	32
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura química da fosfatidilcolina.....	34
Figura 4 - Fórmula estrutural do poloxamer	35
Figura 5 - Diagrama esquemático da dupla camada eléctrica na superfície de nanopartículas em solução	38
Figura 6 - Representação tridimensional da interação entre sonda e amostra em um AFM..	40
Figura 7 - Ilustração dos espalhamentos Rayleigh, e Raman Stokes e Anti-stokes	44
Figura 8 - <i>Lippia sidoides</i>	45
Figura 9 - Criança com dermatite atópica infectada por <i>S. aureus</i>	55
Figura 10- Determinação de umidade (balança I.V) da droga vegetal <i>L. sidoides</i> em função do tempo de secagem (estufa de ar circulante 40°C).....	85
Figura 11 - Cromatogramas por CLAE-DAD a 276 nm referentes a (A) timol, (B) óleo essencial de <i>L. sidoides</i> , (C) NCB -nanocápsulas sem ativo, (D) NCLS.....	92
Figura 12 - Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE-DAD, referente a sete concentrações de timol (4-180 µg/mL) avaliadas no estudo da linearidade do método para quantificação de timol em OELS e NCLS.	93
Figura 13 - Resíduos referente a curva de linearidade de cinco concentrações de OELS (A) e de NCLS (B).....	94
Figura 14 - Distribuição de tamanho por intensidade das formulações de nanosistemas contendo OELS obtidas na primeira etapa do desenvolvimento.....	102
Figura 15 - Aparência macroscópica da suspensão de NCLS (A, B), e microscópica (C) por microscopia óptica – aumento de 1000 x	105
Figura 16 - Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente a NCLS	106
Figura 17 - Imagens das NCLS, obtidos através de varredura por sonda mecânica (microscopia de força atômica).....	108
Figura 18 - Curva de DSC referente ao óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OELS)	111
Figura 19 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes ao polímero PLGA (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e PLGA (vermelho).....	111

Figura 20 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes ao polímero poloxamer (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e poloxamer (vermelho)	112
Figura 21 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes a fosfatidilcolina (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e fosfatidilcolina (vermelho)	112
Figura 22 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes à NCLS (azul), óleo essencial OELS (preto), e a mistura física dos componentes das NCLS (vermelho).	113
Figura 23 - Espectro Raman dos componentes isolados e dos nanosistemas. (A) OELS (óleo essencial de <i>L. sidoides</i>), fosfatidilcolina, poloxamer 407, PLGA, NCLS (nanocápsulas contendo OELS), NCB (nanocápsulas sem OELS); (B) comparação entre os espectros das NCLS (nanocápsulas contendo OELS), NELS (nanoemulsão contendo OELS), NEB (nanoemulsão sem OEL)	119
Figura 24 - CIM e CBM frente à cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (A) nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> - NCLS; (B) Óleo essencial de <i>L. sidoides</i> – OELS	125
Figura 25 - Avaliação da toxicidade do OELS (A), NCLS (B), e do TIM (C) em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).	129
Figura 26 - Efeito de OELS (A), TIM (B) e NCLS (C) sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT	132
Figura 27 - Efeito das NCLS e OELS no edema de orelha induzido por TPA em camundongo	137
Figura 28 - Efeito das Nanocápsulas Brancas (NCB) sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.	137
Figura 29 - Efeito do PLGA e do timol sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.	138
Figura 30 - Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> (NELS) sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.	140
Figura 31 - Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (NELS) sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase induzida por TPA em orelha de camundongo.	141
Figura 32 - Perfil de quimioluminescência de OELS dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).	144
Figura 33 - Perfil de quimioluminescência de TIM dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).	145
Figura 34 - Perfil de quimioluminescência do OELS dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos)	146

Figura 35 - Perfil de quimioluminescência de TIM dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).....147

Figura 36 – Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) e nanocápsulas contendo OELS (NCLS) sobre a redução do radical DPPH.149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo experimental para verificação da precisão intermediária.....	68
Tabela 2 - Protocolo experimental para preparo das soluções utilizadas na verificação da exatidão.....	69
Tabela 3 - Parâmetros avaliados na verificação da robustez	70
Tabela 4 - Composição das formulações da primeira etapa do desenvolvimento de nanocápsulas	71
Tabela 5 - Teor de umidade nas folhas pulverizadas de <i>L. sidoides</i> conforme metodologia empregada.....	86
Tabela 6 - Teor de cinzas, extrativos em etanol e óleo essencial nas folhas de <i>L. sidoides</i> ..	87
Tabela 7 - Resultados da prospecção fitoquímica de folhas de alecrim-pimenta.....	88
Tabela 8 - Constituintes químicos presentes no óleo essencial de <i>L. sidoides</i> determinados por CG-EM.....	90
Tabela 9 - Avaliação da Precisão intra-corrída (repetibilidade) do método para dosagem de timol em OELS por CLAE-DAD.	96
Tabela 10 - Avaliação da Precisão intra-corrída (repetibilidade) do método para dosagem de timol em NCLS por CLAE-DAD.	96
Tabela 11 - Avaliação da Precisão inter-corrída (precisão intermediária) do método para dosagem de timol em OELS por CLAE-DAD.	97
Tabela 12 - Avaliação da Precisão inter-corrída (precisão intermediária) do método para dosagem de timol em NCLS por CLAE-DAD	97
Tabela 13 - Avaliação estatística dos resultados referentes ao ensaio de precisão intermediária para o OELS.....	97
Tabela 14 - Avaliação estatística dos resultados referentes ao ensaio de precisão intermediária para NCLS	98
Tabela 15 - Resultados da análise de exatidão do método para doseamento de timol em OELS.....	98
Tabela 16 - Resultados da análise de exatidão do método para doseamento de timol em NCLS.....	99
Tabela 17 - Influência dos parâmetros temperatura, coluna e fluxo da fase móvel na robustez do método de quantificação do ativo timol em OELS	99
Tabela 18 - Caracterização quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanosistemas contendo OELS desenvolvidos na primeira etapa.	100

Tabela 19 - Tamanho e índice de polidispersão de nanocápsulas contendo OELS produzidas na segunda etapa do desenvolvimento.....	105
Tabela 20- Quantificação de timol em óleo essencial e nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>L. siddoides</i>	109
Tabela 21 - Relação entre substâncias e eventos apresentados nas curvas termoanalíticas de DSC.....	113
Tabela 22 - Parâmetros avaliados na estabilidade das NCLS.	122
Tabela 23 - Resultados referentes ao ensaio de CIM e CBM de NCLS e OELS frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	124

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos	25
2.1.1 Nanosistemas	27
2.1.2 Nanopartículas poliméricas	27
2.1.3 Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas	29
2.1.5 Polímero biodegradável Poliácido lático-co-glicólico - PLGA	31
2.2 Caracterização dos nanosistemas	35
2.2.1 Distribuição de tamanho das partículas	36
2.2.2 Potencial zeta	37
2.2.3 Microscopia de força atômica	39
2.2.5 Espectroscopia de Raman aplicada a análise de fármacos	43
2.3 Óleo essencial de Lippia sidoides Cham	45
2.4 Avaliação do potencial antioxidante	48
2.5 Processo inflamatório	51
2.6 Modelos animais de inflamação	52
2.7 Dermatites	53
2.7.1 Farmacoterapia da Dermatite	56
3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. MATERIAL E MEDODOS	61
4.1 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal	61
4.1.1 Material botânico	61
4.1.2 Determinação do tempo de secagem	61
4.1.3 Análise granulométrica	61

4.1.4	Determinação da umidade (teor de água) na droga pulverizada	62
4.1.5	Teor de cinzas: totais e insolúveis em ácido	62
4.1.6	Teor de óleo essencial	63
4.1.7	Teor de extrativos em etanol	63
4.1.8	Prospecção fitoquímica	64
4.2	Caracterização química do OELS por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas	64
4.3	Validação de metodologia analítica para doseamento de timol em óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e em nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> por CLAE-DAD	64
4.3.1	<i>Especificidade</i>	66
4.3.2	<i>Linearidade e intervalo</i>	66
4.3.3	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	67
4.3.4	<i>Precisão</i>	67
4.3.5	<i>Repetibilidade</i>	68
4.3.6	<i>Precisão intermediária</i>	68
4.3.7	<i>Exatidão/Recuperação</i>	68
4.3.8	<i>Robustez</i>	70
4.4	Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (NCLS)	70
4.4.1	<i>Método de preparo das formulações</i>	70
4.4.2	<i>Desenvolvimento da formulação</i>	71
4.5	Caracterização das nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (NCLS)	72
4.5.1	<i>Análise do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz</i>	72
4.5.2	<i>Determinação do potencial zeta</i>	72
4.5.3	<i>Análise morfológica das nanocápsulas através de microscopia de força atômica (MFA)</i>	73
4.5.4	<i>Doseamento - Quantificação do marcador timol em nanocápsulas de <i>L. sidoides</i></i>	73
4.5.5	<i>Avaliação da eficiência de encapsulação</i>	74
4.5.6	<i>Estudo termoanalítico: Análise térmica por DSC</i>	74

4.5.7 Caracterização quanto as propriedades vibracionais: Análise por microscopia Raman.....	75
4.6 Estudos preliminares de estabilidade das NCLS.....	76
4.6.1 Análise macroscópica das formulações.....	76
4.6.2 Avaliação da estabilidade das nanocápsulas.....	76
4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana do OELS e das NCLS frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538P.....	76
4.7.1 Preparo das amostras.....	76
4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	77
4.7.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	77
4.8 Avaliação da atividade antioxidante/sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das NCLS e OELS.....	78
4.9 Ensaios em cultura de células.....	79
4.9.1 Material biológico.....	79
4.9.2 Isolamento de polimorfonucleares (PMNs).....	79
4.9.3 Avaliação da citotoxicidade através do efeito do OELS, timol e NCLS em neutrófilos humano mensurado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT.....	79
4.9.4 Avaliação do potencial anti-inflamatório tópico das NCLS em camundongos.....	81
4.10 Avaliação dos efeitos do OELS e do timol, sobre o metabolismo oxidativo induzido por PMA em neutrófilos, empregando a técnica de Quimioluminescência.....	82
4.11 Análise Estatística.....	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal L. sidoides.....	85
5.2 Validação de metodologia analítica para doseamento de timol em óleo essencial de L. sidoides e em nanocápsulas contendo óleo essencial de L. sidoides por CLAE-DAD.....	91
5.2.1 Seletividade.....	91
5.2.2 Linearidade e intervalo.....	93
5.2.3 Limites de detecção e quantificação.....	95
5.2.4 Precisão.....	95
5.2.5 Exatidão/ Recuperação.....	98

5.2.6 Robustez.....	99
5.3 Desenvolvimento da formulação de nanocápsulas	100
5.4 Caracterização das nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i>	105
5.4.1 Análise morfológica das nanocápsulas através de microscopia de força atômica (AFM).....	107
5.4.2 Doseamento - Quantificação do marcador timol em nanocápsulas de <i>L. sidoides</i>	108
5.4.3 Eficiência de encapsulação	109
5.4.4 Estudo termoanalítico: Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	110
5.4.5 Caracterização quanto às propriedades vibracionais: Análise por microscopia Raman.....	116
5.5 Estudos de estabilidade dos nanosistemas (nanocápsulas) produzidas com OELS	120
5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana do OELS e das NCLS frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	123
5.7 Avaliação do efeito do OELS, TIMOL e NCLS em neutrófilos humano mensurado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT.....	127
5.7.1 Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)	127
5.7.2 Teste do MTT.....	130
5.8 Avaliação do potencial anti-inflamatório tópico das NCLS em camundongos	134
5.9 Avaliação dos efeitos do OELS e do timol, sobre o metabolismo oxidativo induzido por PMA em neutrófilos, empregando a técnica de quimioluminescência	143
5.9.1 Quimioluminescência dependente de luminol.....	143
5.9.2 Quimioluminescência dependente de lucigenina.....	145
5.10 Avaliação da atividade antioxidante/sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das NCLS e OELS.....	148
6. CONCLUSÕES.....	152
7. REFERÊNCIAS.....	155

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A grande biodiversidade da caatinga constitui uma de suas maiores riquezas sendo fonte potencial para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (Albuquerque et al., 2007). A espécie *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é um arbusto do Nordeste do Brasil, encontrado principalmente nos estados do Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (Lorenzi, Matos, 2002; Nunes et al., 2006).

Esta planta está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), e já é utilizada como anti-séptico local na forma de infusão, tintura e extrato das folhas em programas públicos de fitoterapia em muitos estados brasileiros (Brasil, 2009). No entanto até o momento não existem fitoterápicos registrados ou produtos tecnológicos disponíveis no mercado que utilizem os derivados desta espécie.

Das folhas de *L. sidoides* extrai-se um óleo essencial que possui dentre os constituintes químicos majoritários timol e carvacrol, moléculas de renomada atividade antimicrobiana e antifúngica (Bertini et al., 2005; Fontenelle et al., 2007). Estudos relacionados ao óleo essencial de *L. sidoides* descrevem atividade antimicrobiana frente a diversas espécies de bactérias e fungos, (Bertini et al., 2005; Botelho et al., 2009; Vieira et al., 2006; Costa et al., 2011; Veras et al., 2014; Bersan et al., 2014).

Colutórios preparados à base do óleo essencial de *L. sidoides* promoveram a redução da placa bacteriana e gengivite em humanos, com resultados semelhantes à clorexidina (Botelho et al., 2009) e impediu a progressão da doença periodontal em cães, com redução significativa dos escores clínicos gengivais (Girão et al, 2003). A associação entre o óleo essencial de *Lippia sidoides* (0,5%) e extrato de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), na forma de gel, demonstrou atividade anti-inflamatória e antibacteriana em modelo experimental de periodontite. Esse tratamento reduziu a atividade da mieloperoxidase e inibiu a produção de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival de ratos, bem como preveniu o crescimento de patógenos orais (Botelho et al., 2007).

Outros trabalhos relatam atividade anti-inflamatória tópica (Veras et al, 2013; Monteiro et al., 2007), e antioxidante (Monteiro et al., 2007; Alves et al., 2003),

e imunomoduladora, suprimindo as respostas imunes humoral e celular (Leite, 2003). Tendo em vista estas características, o óleo essencial extraído das folhas da espécie *L. sidoides* (OELS) se mostra promissor para a pesquisa e o desenvolvimento de formulações de uso tópico visando o tratamento de processos inflamatórios que podem ser desencadeadas ou agravados por infecções microbianas.

No entanto sabe-se que a aplicação direta de óleos essenciais sobre a pele pode causar lesões locais e reações de fotossensibilidade dependendo da concentração e da natureza química dos seus constituintes (Bakkali et al., 2008). O desenvolvimento de formulações farmacêuticas baseadas em nanocarreadores, têm demonstrado inúmeras vantagens frente a formulações convencionais, tornando esta linha de pesquisa uma promissora e inovadora área do setor farmacêutico (Zanetti-Ramos *et al.*, 2008; Dimer et al., 2013).

Estes sistemas podem ser administrados por diferentes vias, onde incluem: a via ocular, oral, intraperitoneal, intramuscular, pulmonar, cutânea, subcutânea e endovenosa (Barrat, 2000). Dentre as vantagens do nanoencapsulamento está a possibilidade de diminuição da toxicidade inerente ao fármaco, direcionamento do ativo a alvos específicos e aumento da estabilidade da formulação (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010; Mahapatro & Singh, 2011). O desenvolvimento tecnológico de derivados de produtos naturais, como é o caso dos óleos essenciais, requer conhecimentos prévios acerca da droga vegetal e seu derivado. Caracterização do material vegetal (estudos farmacognósticos), padronização das condições de extração, caracterização química, quantificação de marcadores, estudos de segurança e eficácia são etapas críticas do processo que irão definir a qualidade e reprodutibilidade do produto final desenvolvido (Leal et al., 2003; Araruna et al., 2013; Pierdona et al., 2014; de Fatima et al., 2012).

Enfim, diante do exposto o desenvolvimento tecnológico de nanosistemas incorporando óleo essencial de *L. sidoides* representa uma alternativa inovadora para derivados de produtos naturais que possuem grande potencial farmacológico, porém alguma limitação toxicológica. Neste contexto o presente trabalho visa a partir da matéria-prima vegetal (folhas de *L. sidoides*) e seu derivado (óleo essencial), realizar ensaios de caracterização, quantificação, nanoencapsulação, e estudos preliminares de segurança e eficácia que possam subsidiar no futuro o

desenvolvimento de um medicamento nanotecnológico a base de óleo essencial de *L. sidoides* para dermatites e outras doenças inflamatórias da pele.

Revisão bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos

A nanotecnologia é uma tecnologia emergente apontada como a quinta revolução industrial e o futuro da próxima geração (Rai & Rai 2015). Enquanto a nanociência estuda os fenômenos naturais que regem o comportamento de átomos, moléculas e estruturas na escala nanométrica, a nanotecnologia pode ser entendida como a aplicação da nanociência para o controle e manipulação da matéria estruturada no nível molecular e atômico, de forma a desenvolver estruturas e sistemas que apresentam propriedades significativamente diferente daquelas observados em escala micro ou macroscópica (ABDI, 2010).

Partículas em escala nanométrica têm como característica apresentarem uma grande área superficial por unidade de volume e, desta maneira, podem exibir propriedades peculiares e de interesse em diversos ramos da tecnologia. Geralmente, materiais em nanoescala apresentam melhorias significativas em suas propriedades ópticas, elétricas, mecânicas, e magnéticas, que são desejáveis em muitas aplicações industriais (Zoccal, 2010).

Na sua definição mais estrita a nanotecnologia refere-se a estruturas na faixa de tamanho entre 1-100 nm em pelo menos uma dimensão. Apesar desta restrição de tamanho, muitas áreas do conhecimento consideram como nanotecnologia estruturas de várias centenas de nanômetros (Farokhzad & Langer, 2009). Na área da saúde, a *European Medicines Agency* define a nanotecnologia como o uso de pequenas estruturas menores que 1000 nm de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas (Dimer et al., 2013).

Essencialmente multidisciplinar, a nanotecnologia tem aplicação em diversos campos como energia, meio ambiente, eletrônica, têxtil, medicina, cosméticos, agricultura, entre outros (Rai & Rai 2015). Devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem gerar ao desenvolvimento tecnológico e econômico, vários grupos de pesquisa em todo o mundo têm mostrado interesse em trabalhar nesta área (Duran, Morais, Mattoso, 2006).

O investimento do governo Brasileiro em nanociência e nanotecnologia tem crescido de forma expressiva, e a pesquisa brasileira nas áreas farmacêutica e de interface com a biotecnologia tem produzido resultados de vanguarda, onde se destacam os nano-carreadores, usados em cosméticos, medicamentos, e também alguns quimioterápicos antitumorais (Zanetti-Ramos & Creczynski-Pasa, 2008; Dimer et al., 2013).

A proximidade entre universidades e empresas, favorece a criação de parcerias para transferência de tecnologia sendo um fator que possibilita o desenvolvimento e inovação envolvendo produtos nanotecnológicos. A cultura de proteção da produção intelectual dentro da universidade é um ponto chave no sentido de reverter a pesquisa desenvolvida em produtos para o mercado. As indústrias farmacêuticas vislumbram como vantagens da incorporação de ativos em sistemas manométricos a possibilidade de estender a rentabilidade econômica dos medicamentos patenteados, e criar uma nova fonte de receita (DIMER et al., 2013).

Um exemplo de quão promissor pode ser o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à nanotecnologia no meio acadêmico e em parceria com empresas é o medicamento Doxil (produto injetável contendo lipossomas) que foi desenvolvido na Universidade Hebraica de Jerusalém, gerando, em 2004, uma receita de 400 milhões de dólares para a empresa que o comercializa, dos quais 5% (20 milhões de dólares) são destinados a Universidade (Zanetti-Ramos et al., 2008).

Na área da tecnologia farmacêutica aplicada a produtos naturais e fitoterápicos a nanotecnologia representa uma ferramenta poderosa que possibilita contornar problemas farmacotécnicos bem como modular a atividade dos compostos ativos (hatanaka et al., 2011; Rodriguez et al, 2016).

Produtos naturais como extratos, resinas, óleos fixos e óleos essenciais, geralmente apresentam baixa solubilidade, e conseqüentemente conduzem a uma diminuição da biodisponibilidade sistêmica, requerendo administração repetida ou uso de doses mais elevadas, o que torna a droga um pobre candidato ao uso terapêutico (Ansari, Islam, Sameem, 2012).

A incorporação destes derivados vegetais em formas farmacêuticas constituídas de nanosistemas oferece diversas vantagens, como o aumento da solubilidade e biodisponibilidade do ativo, diminuição da toxicidade, aumento da atividade farmacológica com uso de doses reduzidas, aumento da estabilidade,

liberação sustentada, proteção contra a degradação física e química (Rodriguez et al, 2016; Ansari, Islam, Sameem, 2012).

A pesquisa e o desenvolvimento de fármacos incorporados em nanosistemas constitui uma tendência tecnológica capaz de superar barreiras farmacotécnicas possibilitando maior conforto ao paciente por diminuir o intervalo entre as administrações e favorecer a obtenção de produtos com características organolépticas e sensoriais mais agradáveis (Rocha-Filho et al., 2014).

2.1.1 Nanosistemas

Os nanosistemas ou sistemas coloidais incluem as nanoemulsões, nanopartículas poliméricas (nanocápsulas, nanosferas), lipossomas e complexos lipídicos (nanopartículas lipídicas sólidas e carreador lipídico nanoestruturado) estes sistemas podem ser utilizados como vetores de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (Mason et al., 2006; Hadinoto, Sundaresan, Cheow, 2013; Beck, Guterres, Pohlmann, 2011; Venturini et al., 2011; Laouini et al., 2013).

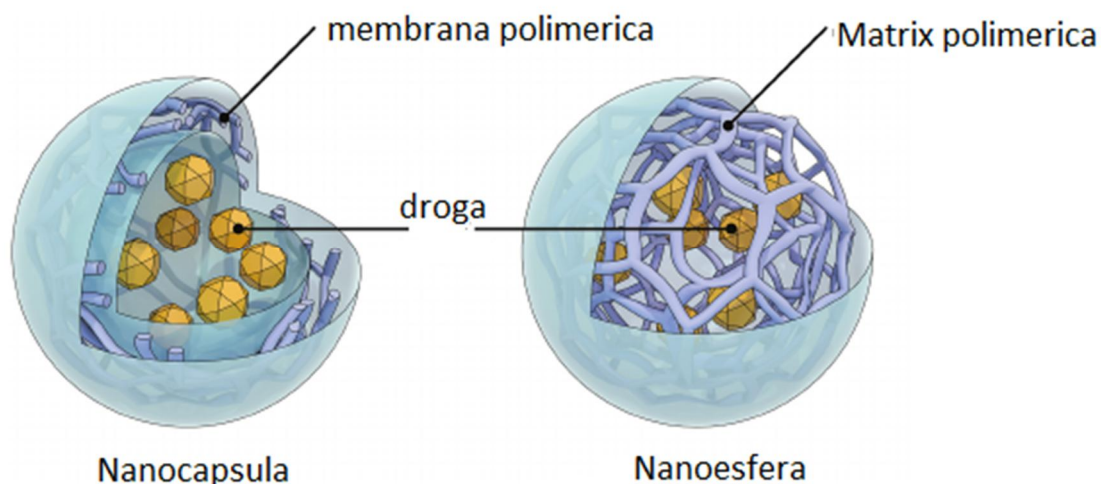
A vetorização é o processo pelo qual uma substância passa a ser liberada de forma seletiva para sítios fisiológicos específicos, como órgãos tecidos ou células, onde a atividade farmacológica é requerida. Um aumento na concentração do fármaco em sítios específicos e/ou redução da toxicidade em sítios não específicos pode levar a índices terapêuticos mais adequados (Yokoyama & Okano, 1996). Estes sistemas têm sido extensivamente estudados para administração oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular, ocular e tópica (Oliveira, Silva, Silva, 2003; Bender et al., 2012; Mahapatro & Singh, 2011; Siqueira-Moura, et al., 2013; Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010).

Dentre os nanosistemas utilizados para veiculação de fármacos, destacam-se as nanopartículas poliméricas, devido a suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluidos biológicos e armazenamento prolongado (GALVIN et al, 2012).

2.1.2 Nanopartículas poliméricas

O termo nanopartículas poliméricas incluem as nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo sua composição e organização estrutural (Figura 1). Nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o ativo estar inserido neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, e são formadas por uma matriz polimérica, onde o ativo pode ficar retido ou adsorvido (Allémann, Gurny, Doelker, 1993; Schaffazick *et. al.*, 2003; Daudt *et al.*, 2013).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B)



Fonte: National Institutes of Health/Department of Health and Human Services

Observa-se um interesse considerável no desenvolvimento de nanopartículas nos últimos anos como sistema para liberação controlada de drogas, tendo em vista que estas partículas poliméricas em escala nanométrica promovem uma melhor absorção dos fármacos e/ou atuam na modulação da distribuição pelo corpo (Farokhzad & Langer, 2009; Sharma *et al.*, 2016).

Os polímeros utilizados na produção destas nanopartículas consistem geralmente em materiais biocompatíveis e biodegradáveis, os quais são decompostos em substâncias atóxicas ao organismo, sendo facilmente excretadas, ou mesmo metabolizadas. Vários polímeros têm sido usados nessas pesquisas tanto

de origem natural, sintética ou semi-sintética. Os mais comumente utilizados são os poliésteres como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PLG) e seus copolímeros, ácidos poli (lático-*co*-glicólico) PLGA, e também, a poli-ε-caprolactona (PCL) (Sharma et al, 2016; Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010; Dalmolin, Khalil, Mainardes, 2016; Pohlmann et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas tem recebido considerável atenção como sistemas de administração de medicamentos devido aos seguintes benefícios (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010; Mahapatro & Singh, 2011):

- Veiculação de compostos lipofílicos (insolúvel nos fluidos orgânicos);
- Proteção contra degradação (oxidação, degradação enzimática ou hidrolítica) do conteúdo encapsulado;
- Liberação controlada e/ou sustentada dos fármacos encapsulados;
- Otimização da dose administrada com consequente diminuição da toxicidade e reação adversa inerente à substância;
- Direcionamento a sítios específicos (tecidos, células, microorganismos).

2.1.3 Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas

Para a preparação de nanocápsulas polímeros, tensoativos hidrofílicos e lipofílicos são utilizados em diversas concentrações, geralmente na faixa de 0,2 a 2% (Devissaguet, Fessi, Puisieux, 1991). Os óleos utilizados podem ser de origem vegetal ou mineral, devendo apresentar ausência de toxicidade e compatibilidade com o polímero, além de alta capacidade de dissolver a droga em questão (Legrand *et al.*, 1999). Compostos ativos lipofílicos em estado líquido como os óleos essenciais podem dispensar a adição de óleo carreador à formulação (Flores et al, 2011).

As vantagens da utilização de nanocápsulas como carreadores de fármacos em relação a outros sistemas como nanoemulsões e lipossomas se deve ao fato da parede polimérica proporcionar uma barreira física de proteção a substância ativa, além da alta eficiência de encapsulação relatada para estes sistemas e a possibilidade de secagem (Pohlmann et al, 2013; Zhang & Youan, 2010; Siqueira-Moura et al, 2013). Estas estruturas são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática e imunológica, aumentar a especificidade de ação, e por consequência, aumentar a atividade terapêutica de

muitas substâncias, resultando assim em doses menores com redução dos efeitos tóxicos (Sharma et al, 2016; Bulcão et al, 2014; Cauchetier et al, 2003; Yurgel, Collares, Seixas, 2013).

Os métodos de preparação de nanocápsulas poliméricas podem ser classificados naqueles que requerem uma reação de polimerização e nos que fazem uso direto de um polímero pré-formado (Souto, Severino, Santana, 2012a, 2012b).

Dentre os métodos baseados na polimerização de monômeros destacam-se a preparação de nanopartículas biodegradáveis com base em reações de polimerização utilizando monômeros de cianoacrilatos de alquilo, que formam polímeros denominados polialquilcianoacrilatos (PACA) (LIU, et al., 2009).

A reação de polimerização de PACA acontece em três fases, que incluem nucleação, onde ocorre a ativação do monômero e geração de carbânios reativos, seguindo-se a fase de propagação ou crescimento do polímero e, por fim, o término da reação (Andrieux et al., 2009). As nanopartículas de PACA são preparadas no seio de emulsões, obtendo-se nanoesferas ou nanocápsulas, conforme a natureza da fase interna da emulsão (Souto, Severino, Santana, 2012a). A obtenção de nanopartículas por este método tem como desvantagem o fato da polimerização *in situ* possibilitar a geração de monômeros e oligômeros residuais tóxicos, bem como ligações covalentes entre o monômero alquilcianoacrilato e a substância ativa, impedindo o controle da massa molecular do polímero, impactando desta forma na liberação do fármaco (Devissaguet, Fessi, Puisieux, 1991).

Por outro lado, a obtenção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados, como os poliésteres alifáticos, constituem o método de escolha de grande parte das pesquisas na área de nanocarreadores (Santos et al., 2013; Moraes et al., 2010; Branquinho et al., 2014; Carreño et al., 2015), pois é um método onde os parâmetros são mais facilmente controláveis, e apresenta maior rendimento, quando comparado a polimerização *in situ* (Souto, Severino, Santana, 2012b). Vale ressaltar que este método se mostra especialmente adequado para incorporar princípios ativos lipofílicos (Souto, Severino, Santana, 2012b).

Em 1989 Fessi et al. propôs um método de obtenção de nanopartículas poliméricas baseado na deposição interfacial de polímero pré-formado que ainda hoje, em virtude de sua praticidade e simplicidade, é um dos métodos mais amplamente utilizados na produção desses sistemas. O emprego desta metodologia

permite preparar nanopartículas com tamanhos entre 150 a 300 nm com alta eficiência de encapsulação (Branquinho et al., 2012; Moraes et al., 2010; Siqueira-Moura, et al., 2013; Santos et al., 2013).

O procedimento consiste em solubilizar polímero e composto ativo lipofílico em um solvente orgânico solúvel em água, como, por exemplo, acetona ou etanol. A utilização de tensoativo lipofílico incluído na fase orgânica como, por exemplo, um fosfolípido, pode ser adequada para prevenir a coalescência das gotículas de óleo. A fase externa é formada por água e um tensoativo hidrofílico como, por exemplo, polissorbato ou poloxâmer. Procede-se então à dispersão da fase interna orgânica na fase externa aquosa, sob agitação magnética, ocorrendo emulsificação espontânea gerando uma nanoemulsão. Em seguida o solvente orgânico é removido à pressão reduzida, formando-se as nanopartículas, como resultado da difusão rápida do solvente do polímero, através da fase aquosa (Galindo-Rodriguez et al. 2004; Sah & Shah, 2015; Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010, Fessi et al, 1989)

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado permite obter nanoesferas ou nanocápsulas. São obtidas nanoesferas quando o princípio ativo se encontra dissolvido ou disperso na solução orgânica polimérica e não há componente oleoso na formulação. São obtidas nanocápsulas quando o princípio ativo é previamente dissolvido num óleo, e este, é adicionado à solução orgânica polimérica antes da dispersão da fase interna na fase externa da emulsão (Souto, Severino, Santana, 2012b; Besheer et al., 2009; Rodriguez et al., 2016; Louchard, Silva, Leal, 2014).

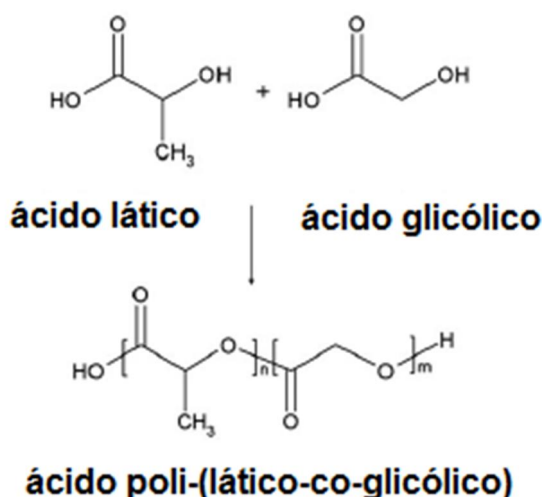
Portanto para a obtenção de nanocápsulas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, as matérias primas imprescindíveis são: polímero biodegradável, componente oleoso e tensoativos. Dentre os polímeros mais utilizados para preparação de nanopartículas poliméricas está o copolímero do poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) (Sharma et al., 2016; Iannitelli et al., 2011; Siqueira-Moura et al., 2013; Louchard, Silva, Leal, 2014; Jose et al., 2016; Makadia, & Siegel, 2011).

2.1.4 Polímero biodegradável Poliácido láctico-co-glicólico - PLGA

Os poliésteres alifáticos constituem um grupo de polímeros sintéticos, não-tóxicos e biodegradáveis que, em meio aquoso sofrem degradação hidrolítica através da clivagem de ligações éster. Os produtos de degradação destes polímeros são ácidos hidroxicarboxílicos atóxicos, que no organismo são metabolizados em dióxido de carbono e água, pela via do ciclo do ácido cítrico (Severino et al., 2011).

O poliéster PLGA é um copolímero de ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) (figura 2). Em termos de design e desempenho, PLGA é o melhor candidato como biomaterial para produção de nanocarreadores de fármacos (Sharma, et al., 2016).

Figura 2 – Estrutura química do PLGA e seus monômero



Fonte: Gentile et al, 2014

O PLGA é sintetizado através de copolimerização aleatória por abertura de anel de dois monómeros diferentes, o ácido glicólico e o ácido lático, na presença de estanho (II), 2-etilhexanoato, de estanho (II) ou alcóxidos de alumínio isopropóxido como o catalisador. Unidades de ácido lático e glicólico são consecutivamente ligadas por meio de ligações éster durante a polimerização, resultando na formação de PLGA (Erbeta et al., 2011; Sharma et al., 2016). Diferentes formas de PLGA podem ser obtidas pela variação da relação entre as proporções de lactídeo e glicolídeo durante a reação de polimerização. O PLGA 50:50, por exemplo, é um copolímero constituído por ácido lático a 50% e ácido glicólico a 50%, podendo ser produzidos também PLGA 75:25, 80:20, entre outros (Makadia & Siegel, 2011; Erbeta et al., 2011).

Dependendo do peso molecular e da proporção lactídeo/ glicolídeo, o tempo de degradação do copolímero pode variar desde vários meses a diversos anos (Sharma et al., 2016; Prokop & Davidson, 2008; Erbeta et al., 2011).

A taxa de degradação do PLGA e a consequente liberação da droga encapsulada podem ser aumentadas quando se utiliza um copolímero com maior hidrofiliabilidade (Sharma et al., 2016). Como o lactídeo é mais hidrofóbico que o glicolídeo, copolímeros de PLGA ricos em lactídeo são menos hidrofílicos, portanto absorvem menos água, e conseqüentemente degradam mais lentamente (Erbeta et al., 2010). Como regra altas quantidades de glicolídeo (PGA) aumentam a degradação do copolímero, com exceção para o PLGA 50:50, que dentre os copolímeros é o que possui a maior taxa de degradação (Makadia & Siegel, 2011).

Por outro lado, o PLGA 50:50 é um dos materiais mais utilizados em sistemas de liberação de fármacos em virtude de proporcionar aos nanocarreadores adequadas características de distribuição de tamanho das partículas, taxa de associação do fármaco e taxas de liberação mais rápida quando comparada aos outros copolímeros de PLGA (Nah, Jeong, Koh, 2000; Janoria & Mitra, 2007).

2.1.6 Tensoativos

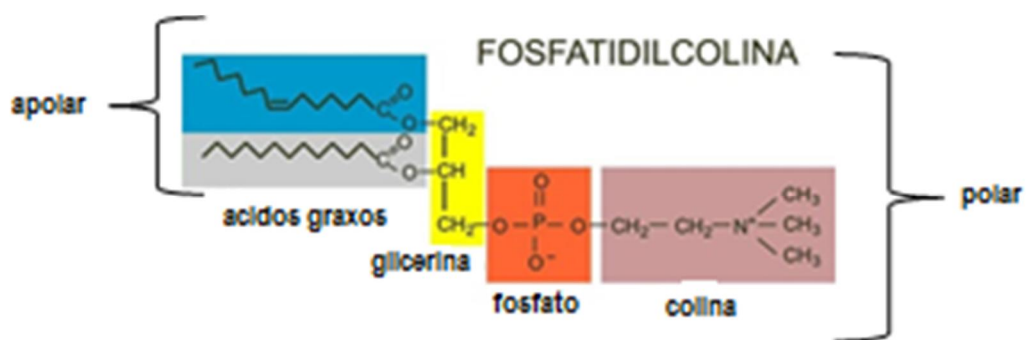
Surfactantes ou tensoativos são substâncias que apresentam a propriedade de se adsorver na superfície ou interfaces de um sistema, alterando de maneira significativa a energia livre superficial ou interfacial. A presença na mesma molécula de regiões com polaridades distintas caracteriza o termo anfifílico (Gomes, 2010).

A fosfatidilcolina é um fosfolipídio que ocorre em todos os organismos celulares visto que é um dos principais componentes da membrana celular. Devido a esta natureza anfifílica são reconhecidos como surfactantes naturais ou biosurfactantes (Wiśnik & Adryanczyk, 2015; Chorilli et al., 2006).

A estrutura molecular da fosfatidilcolina é composta dois grupos polares que, em meio aquoso, tendem a produzir íons de cargas opostas, por isso são consideradas tensoativos anfóteros ou zwitteriônicos (figura 3). Os tensoativos zwitteriônicos são extremamente dependentes do pH da solução em que se encontram, podendo se comportar tanto como tensoativo aniônico (carga negativa)

ou catiônico (carga positiva), ou ainda como não iônico (Gomes, 2010). As lecitinas são consideradas tensoativos de caráter lipofílico biologicamente atóxicos, e por isso tem sido largamente empregada em sistemas nanoestruturados para liberação de drogas (Bender et al, 2012).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura química da fosfatidilcolina



Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/Fosfatidilcolina_miguelferig.jpg

[org/wikipedia/commons/f/f8/Fosfatidilcolina_miguelferig.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/Fosfatidilcolina_miguelferig.jpg)

A fosfatidilcolina pode ser extraída da gema de ovo ou do óleo de soja, se diferenciando pela proporção relativa dos ácidos graxos esterificantes. A lecitina de soja possui um maior número de insaturações nas cadeias carbônicas em relação à de ovo, o que lhe confere uma maior fluidez (Chorilli, 2006).

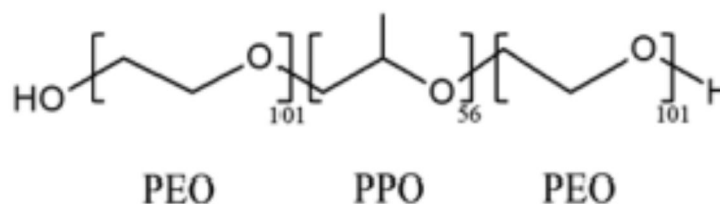
A fosfatidilcolina de soja com 99% de pureza é uma matéria-prima extensivamente utilizada no preparo de nanocarreadores. Apresenta-se como uma pasta semi-sólida de coloração amarela, possui peso molecular 787 g/mol, EHL 6,5, é solúvel em etanol, dispersível em água a 20°C (Lipid, 2016), e devido à presença de insaturações na cadeia possui absorção no ultravioleta (UV) entre 203 e 214 nm (Chorilli et al., 2006).

Os poloxâmeros são tensoativos não iônicos, hidrofílicos, de baixa toxicidade, amplamente empregados em preparações farmacêuticas, incluindo nanosistemas (Besheer et al., 2008; Basak & Bandyopadhyay, 2013).

Poloxamer é um termo genérico utilizado para designar copolímeros em bloco de origem sintética constituídos de propilenoglicol de baixo peso molecular adicionado de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (PO) (figura 4). Os copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO estão disponíveis em várias proporções de

pesos moleculares com razões diferentes de PPO/PEO, o que lhes conferem propriedades físico-químicas diferentes, sendo que existem mais de trinta tipos de poloxâmeros comercialmente disponíveis (Alexandridis & Hatton, 1995; Bonacucina et al., 2011).

Figura 4 - Fórmula estrutural do poloxamer



Fonte: Hasegawa et al., 2015

O poloxamer 407, dentre os poloxâmeros, é o que possui maior biocompatibilidade e segurança, podendo ser utilizado em formulações para uso parenteral (Fattahpour et al, 2015; Basak & Bandyopadhyay, 2013). Apresenta-se na forma de um pó branco, pouco higroscópico, em solução aquosa a 2,5% apresenta pH entre 5,0 -7,0, o peso molecular médio é em torno de 12600 g/mol, valor de EHL na faixa entre 18-23, concentração micelar crítica (CMC) 0,725 %, muito solúvel em água, ponto de fusão 56°C, densidade 1,05 g/mL, e comprimento de onda de detecção 630 nm (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; Boletim técnico do fornecedor).

2.2 Caracterização dos nanosistemas

A caracterização físico-química dos nanosistemas é uma etapa de extrema importância, pois permite elucidar aspectos inerentes a nanoestrutura obtida bem como estabelecer parâmetros para avaliar a estabilidade das preparações ao longo do tempo.

A distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial elétrico da superfície (potencial zeta), análise morfológica, comportamento térmico e eficiência de encapsulação são técnicas geralmente empregadas na caracterização (Legrand et al., 1999).

2.2.1 Distribuição de tamanho das partículas

As partículas presentes nos sistemas coloidais estão em constante mobilidade, o que faz com que a intensidade da luz espalhada por elas gere um padrão de movimento. O espalhamento de luz dinâmico, às vezes chamado de espalhamento de luz quasi elástico, é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição do tamanho de partículas na escala nano (10^{-9} cm) e micrométrica (10^{-6} cm). Essa técnica baseia-se na análise do movimento browniano das partículas, ou seja, na capacidade de deslocamento constante das partículas presentes num determinado sistema fazendo com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento (Malvern Instruments, 1996).

A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, a partir da equação de Stokes-Einstein é possível obter o raio hidrodinâmico da partícula e conseqüentemente o diâmetro da partícula (PATTY & FRISKEN, 2006).

$$R_h = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

Onde:

R_h é o raio hidrodinâmico,

K é a constante de Boltzmann,

T é a temperatura absoluta,

η é a viscosidade da amostra e

D o coeficiente de difusão translacional das partículas.

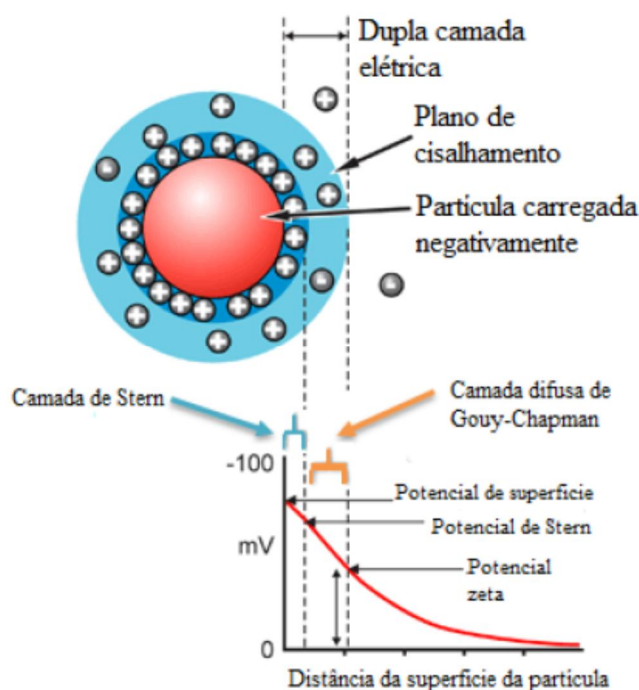
A determinação do tamanho das partículas em nanosistemas é fator norteador no desenvolvimento tendo em vista que dependendo da finalidade o tamanho está intrinsecamente relacionado à eficiência do nanocarreador. Exemplo disto são as nanopartículas desenvolvidas para administração parenteral, que devem ter tamanho inferior a 300 nm, pois acima deste diâmetro são rapidamente reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear e facilmente retiradas da

circulação. Outro fato é que a monitoração do diâmetro das partículas em função do tempo permite avaliar a tendência à agregação e sedimentação indicativas de instabilidade na suspensão coloidal (Schaffazick *et al.*, 2003).

2.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, é a medida do potencial elétrico entre a superfície externa da camada de íons que se desenvolve ao redor das partículas em suspensão e o meio dispersante (Moraes, 2009). As partículas quando estão em suspensão podem possuir carga na superfície, criando uma camada compacta de íons ao seu redor, que difere do meio dispersante. Por exemplo, quando a partícula possui carga negativa, ela faz com que os íons positivos presentes no líquido dispersor (chamados contra-íons) formem uma rígida camada adjacente ao redor de sua superfície; esta camada de contra-íons é conhecida como camada de Stern (Figura 5). Outros íons positivos podem ser atraídos pela partícula negativa, mas estes agora são repelidos pela camada de Stern. Desta forma ocorre um equilíbrio dinâmico que resulta na formação de uma camada difusa de contra-íons, os quais são menos numerosos conforme aumenta a distância da superfície da partícula (Hunter, 2013).

Figura 5 - Diagrama esquemático da dupla camada eléctrica na superfície de nanopartículas em solução



Fonte: Maia, 2014

A camada difusa pode ser entendida como uma atmosfera de íons difusa rodeando a partícula. A partícula negativa e sua atmosfera carregada positivamente produzem um potencial elétrico relativo na solução. Este potencial tem um valor máximo na superfície e diminui gradualmente conforme a distância, aproximando-se de zero fora da camada difusa. A diferença de potencial e espessura da nuvem eletrônica a partir da superfície da partícula é um indicador da força repulsiva das partículas em solução. Um baixo valor de potencial zeta significa uma nuvem eletrônica pouco densa ao redor da partícula, e desta forma a repulsão entre partículas adjacentes é menor, favorecendo fenômenos de floculação. Portanto de maneira geral partículas que apresentam em suspensão potencial zeta +30 mV ou -30 mV normalmente conferem estabilidade ao sistema (Malvern, 2009).

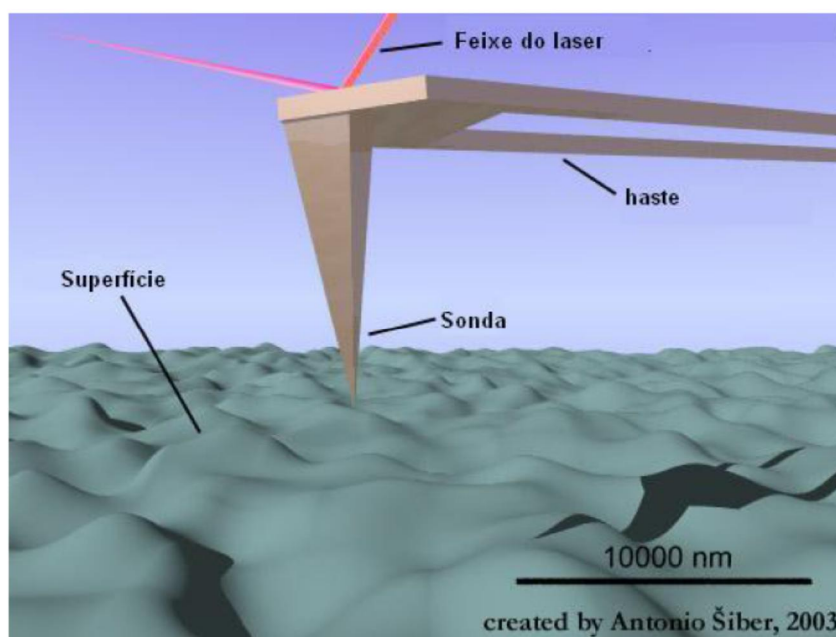
O potencial zeta é determinado por eletroforese e pode ser obtido em um equipamento de espalhamento de luz, pois a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética. O potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, já que indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas (Florence & Attwood, 2003; Malvern, 2009).

Os valores de potencial zeta podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero e do material usado para modificação de sua superfície (Soppimath *et al.*, 2001). Os fosfolípidos, os poloxâmeros e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes que podem afetar o potencial zeta, por estarem envolvidos na formação do envoltório e adsorvidos a ele (Legrand *et al.*, 1999).

2.2.3 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) utiliza a técnica de microscopia de tunelamento cujo princípio básico consiste na detecção da interação entre uma ponta de prova e a superfície de uma amostra. Com o AFM, é possível resolver detalhes em escala atômica tanto em superfícies condutoras como em isolantes. Nesse método, uma alavanca flexível e sensível à força (haste), munida de uma ponta muito fina (sonda) é deslocada com um padrão de rastreamento sobre a superfície da amostra. Na análise da superfície da amostra é varrida e mantida afastada da superfície do material a uma distância previamente ajustada. As forças que atuam entre a alavanca e a superfície da amostra causam flexões diminutas na haste, que são detectadas por meios óticos (feixe de laser) (Figura 6). Ao realizar a varredura, o movimento para cima e para baixo da ponta reflete a topografia da superfície (Skoog, 2002).

Figura 6 - Representação tridimensional da interação entre sonda e amostra em um AFM



Fonte: Antônio Siber, 2003

As forças de interação entre sonda e amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância entre elas. A distâncias maiores que $1\ \mu\text{m}$, praticamente não existe interação. Conforme a sonda se aproxima da amostra (distancia em torno de $50\ \text{nm}$), forças atrativas (Van der Waals) passam a atuar entre a sonda e amostra, aumentando conforme a proximidade da sonda, até que a separação seja da ordem inter-atômica (aproximadamente $0,5\ \text{nm}$). A partir deste ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas, e diz que a sonda está em contato físico com a amostra (Neves *et al.*, 1998).

Segundo Neves et al., (1998) os modos de operação na técnica da AFM são definidos conforme o caráter de interação sonda-amostra, podendo ser classificados em:

∅ Não contato: a interação sonda-amostra é atrativa, possui a vantagem de não danificar a amostra, porém a resolução é baixa em decorrência da ausência de contato físico com amostra;

∅ Contato: interação sonda-amostra repulsiva, resolução a nível atômico, porém o atrito entre sonda e superfície da amostra pode produzir uma imagem distorcida;

∅ Contato Intermitente: interação sonda-amostra ora atrativa, ora repulsiva. A sonda oscila sobre a superfície da amostra com contato físico, porém a movimentação é feita no ar. Assim, são obtidas altas resoluções, eliminando problemas de deformação.

As imagens obtidas por AFM são tridimensionais, possibilitando a reconstrução exata dos aspectos morfológicos da superfície analisada. Diferente de outras técnicas de microscopia o preparo de amostra para AFM é simples, em virtude de dispensar uso de vácuo durante a operação e a amostra não necessitar ser condutiva (Neves *et al.*, 1998). Assim, amostras biológicas podem ser preparadas pela deposição de uma gota em um substrato, como por exemplo, a mica. A mica é um mineral com superfície atômica plana e com plano basal de clivagem muito baixo, permitindo sua fácil utilização (Pereira, 2006).

A análise de nanosistemas por AFM permite visualizar detalhes morfológicos como forma geométrica, presença de aglomerados, e detalhes da superfície das partículas, e em alguns casos pode-se ainda pesquisar as propriedades mecânicas da estrutura (Gonzaga et al., 2014; Leite et al., 2005).

2.2.4 Emprego de calorimetria exploratória diferencial em nanosistemas poliméricos

As técnicas termoanalíticas, dentre as quais se destaca a calorimetria exploratória diferencial (DSC) possuem grande importância no âmbito farmacêutico podendo ser aplicadas tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e na caracterização de novas formas farmacêuticas, como é o caso dos nanosistemas poliméricos (Santana et al., 2008; Sun et al., 2015).

As modificações das propriedades físicas, morfológicas ou químicas das substâncias em uma determinada faixa de temperatura ocorrem com consumo de energia disponível no sistema (alterações endotérmicas) ou com liberação de energia para o meio (alterações exotérmicas). Baseado neste princípio desenvolveu-se a técnica de calorimetria exploratória diferencial (Lucas, Soares, Monteiro, 2001).

Uma ampla gama de produtos pode ser caracterizada com o emprego da técnica de DSC, entre os quais destacam-se os polímeros (Erbetta et al., 2010). Os registros obtidos a partir da técnica de DSC são chamados termogramas, onde ficam registrados os fenômenos endo e exotérmicos. Informações como temperatura de fusão, temperatura de transição vítrea, nível de perfeição dos cristalitos e grau de cristalinidade dos polímeros são algumas das informações que podem ser obtidas pela técnica de DSC. A temperatura de fusão indica a temperatura em que a amostra se encontra totalmente fundida e é o valor expresso no pico do termograma nos eventos endotérmicos (Winefordner, 1993).

A temperatura de transição vítrea (T_g) é um evento que compreende apenas a porção amorfa do material polimérico. A partir da T_g a mobilidade dos segmentos da cadeia polimérica torna-se maior e o polímero passa do estado vítreo para um estado mais maleável, apesar de não ocorrerem mudanças estruturais. Abaixo da T_g o polímero não possui energia suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação a outra por mudanças conformacionais. Neste estado vítreo o polímero apresenta-se duro, rijo e quebradiço. A T_g pode ser considerada como a temperatura na qual se inicia o movimento dos segmentos da cadeia polimérica. No termograma a T_g pode ser observada como uma descontinuidade da linha de base que muitas vezes, de tão sutil, é de difícil visualização (Canevarolo, 2004).

Os eventos endotérmicos detectados pela técnica de DSC são em geral fusões, desolvatações, transições vítreas e mais raramente decomposições. Uma reação exotérmica detectada por DSC usualmente representa um processo de reorganização molecular tal como cristalizações (Sinko, 2006).

O emprego da técnica de DSC para análise de nanossistemas permite avaliar interações entre os componentes da formulação, onde em alguns casos permite prever processos de instabilidade, ou inferir se o fármaco se encontra na forma cristalina, ou sua localização no nanocarreador (Musimeci et al., 2006; Teixeira et al., 2005).

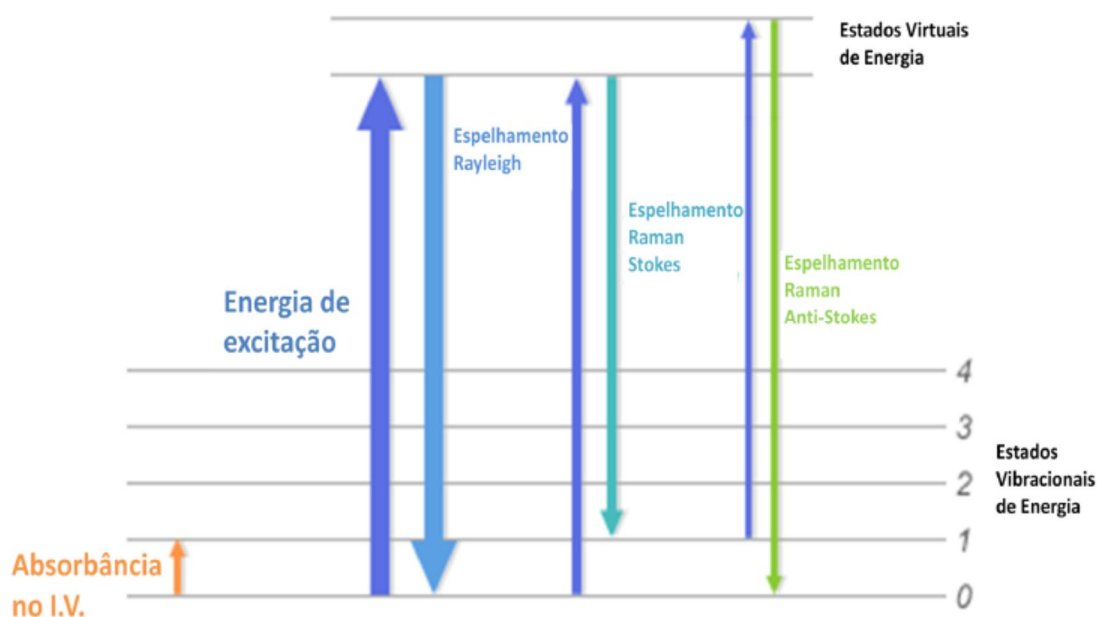
Além da análise térmica por DSC, a caracterização de nanossistemas por espectrometria de Raman é uma tendência que vem crescendo nos últimos anos (Vecchione et al, 2016; Bakhshi, Shokuhfar & Afghahi, 2015).

2.2.5 Espectroscopia de Raman aplicada a análise de fármacos

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica com ampla aplicação na área farmacêutica e das ciências biológicas em geral, pois permite analisar amostras líquidas, sólidas, transparentes ou não e com diferentes texturas de superfície desde que opticamente acessíveis. Esta técnica requer pouca ou nenhuma preparação de amostra e fornece resultados com alta especificidade (Schmit & Popp, 2006).

Em linhas gerais o efeito Raman nada mais é do que o espalhamento inelástico da luz pela matéria, com isso pode haver um aumento ou diminuição da energia de rotação ou vibração do centro espalhador. De acordo com a teoria clássica, sempre que uma onda eletromagnética interage com um determinado material, a radiação espalhada pode apresentar uma frequência igual à radiação incidente (conhecido como espalhamento Rayleigh) ou com frequências menores ou maiores que ela (conhecidas como espalhamento Raman Stokes e Anti-stokes respectivamente) (figura 7). Estas diferenças entre as energias da radiação incidente e espalhada estão relacionadas às diversas propriedades vibracionais de cada material. As emissões Raman por um determinado material podem ser observadas através de uma radiação monocromática excitada nas regiões do ultravioleta, visível ou infravermelho (Sala, 1996).

Figura 7 - Ilustração dos espalhamentos Rayleigh, e Raman Stokes e Anti-stokes



Fonte: Almeida, 2013

A espectroscopia Raman atua na mesma região espectral que a espectroscopia de absorção no infravermelho, ambas as técnicas avaliam as transições entre níveis vibracionais. Geralmente as bandas referentes aos modos normais de vibração que aparecem mais fracos no infravermelho, aparecem mais fortes no Raman e vice-versa (Sala, 1996).

Na caracterização de suspensões, a aplicação da técnica Raman representa uma importante alternativa visto que a interferência da vibração das moléculas de água presentes no solvente é muito menor em comparação com a espectroscopia no infravermelho (Hasegawa et al, 2015).

Atualmente espectrômetros de Raman portáteis com curtos tempos de aquisição e resoluções espectrais razoáveis já estão disponíveis no mercado, e isto tem aumentado o interesse e a aplicabilidade dessa técnica na indústria química e farmacêutica (Jentzsch et al, 2015).

No caso de óleos essenciais diversos são os estudos que utilizam a espectrometria Raman para caracterização qualitativa do material. , pois esta é uma técnica não destrutiva que fornece de maneira rápida o *fingerpint*, ou seja, a

assinatura química da substância (Jentzsch & Ciobotă, 2014; Almeida et al, 2013), sendo útil também para identificar possíveis adulterações (Jentzsch et al, 2015).

A espectrometria Raman pode contribuir no controle de qualidade de óleos essenciais, possibilitando inclusive a distinção de isômeros, como timol e carvacrol (Daferera et al, 2002), que são constituintes majoritários em óleos essenciais de diversas espécies, como *Thymus vulgaris*, *Plectranthus amboinicus*, e *Lippia sidoides* (Muñoz-Acevedo, Kouznetsov, Stashenko, 2009).

2.3 Óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham

Lippia sidoides Cham (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim-pimenta, alecrim-do-nordeste, estrepa cavalo, alecrim bravo (Lorenzi, Matos, 2002), é um arbusto do Nordeste do Brasil, encontrado principalmente nos estados do Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (NUNES et al, 2005). As folhas juntamente com as flores constituem a parte medicinal desta planta (figura 8), que é utilizada popularmente como anti-séptico local sob a forma de infusão ou tintura, para tratar infecções da pele e garganta (Lorenzi, Matos, 2002).

Figura 8 - *Lippia sidoides*



Fonte: Silveira, E. R. S.

Esta planta é uma das espécies presentes na RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), lista elaborada pelo Ministério da Saúde e constituída de plantas medicinais que apresentam potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS (Brasil, 2009).

Das folhas de *Lippia sidoides* extrai-se um óleo essencial quimicamente constituído por timol, carvacrol, terpineno, p-cimeno, α -cariofileno, e outros terpenos em menores quantidades (Matos, 2007; Oliveira, 2009). O timol, componente majoritário do óleo, é um dos mais potentes anti-sépticos naturais que se conhece, apresentando pronunciada atividade antibacteriana e antifúngica (Bertini et al., 2005; Fontenelle et al., 2007).

Ensaio *in vitro* com óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) demonstraram largo espectro de inibição, abrangendo bactérias gram-positivas e negativas como: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Streptococcus mutans* (Aguiar; Matos; Moura, 1984; Bertini et al., 2005; Botelho et al., 2009). O potencial antifúngico do óleo essencial foi demonstrado para *Microsporum canis* e *Candida* spp., *Trichophyton rubrum*, (Botelho et al., 2007a; Fontene et al., 2007)

O OELS e seu hidrolato mostraram ação larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O timol foi identificado como o princípio ativo responsável por essa ação, causando 100% de mortalidade larval na menor concentração testada (0,017%) (Carvalho et al., 2003).

O OELS demonstrou inibir o crescimento de *Leishmania chagasi* forma promastigota, sendo a ação dose dependente (Oliveira et al., 2009). Borges et al. (2012) verificou que o OELS possui atividade tripanossomicida contra T cruzi, apresentando para a forma epimastigota IC₅₀ de 28.9 \pm 4.9 ug/mL, para tripomastigota LC₅₀ de 10.3 \pm 0.5 ug/mL e para a forma L mastigota IC₅₀% de 41.7 \pm 12.3 ug/mL.

Colutórios preparados à base do OELS promoveram a redução da placa bacteriana e gengivite em humanos, com resultados semelhantes à clorexidina (Botelho et al., 2009) e impediu a progressão da doença periodontal em cães, com redução significativa dos escores clínicos gengivais (Girão et al, 2003).

A associação entre o OELS (0,5%) e extrato de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), na forma de gel, demonstrou atividade anti-inflamatória e antibacteriana em modelo experimental de periodontite. Esse tratamento reduziu a atividade da mieloperoxidase e inibiu a produção de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival de ratos, bem como preveniu o crescimento de patógenos orais (Botelho et al., 2007).

A aplicação tópica do OELS em camundongos nas doses de 1 e 10 mg/orelha, respectivamente reduziu significativamente ($P < 0,05$) em 45,93 e 35,26%, o edema agudo de orelha induzido por 12 otetradecanoylphorbol 13-acetato (TPA). Neste mesmo estudo foi verificado efeito gastroprotetor pelo pré-tratamento oral com óleo essencial em doses de 10, 50 e 100 mg/kg, que, respectivamente, inibiram significativamente ($P < 0,05$) 58,33, 45,83 e 41,66% os danos produzidos pelo etanol, e não alterou o peso nem as proteínas da mucosa gástrica dos animais (Monteiro et al., 2007).

Veras, et al. (2013) verificaram que a aplicação tópica de 2 mg/orelha de OELS, e de timol, reduziu significativamente ($p < 0.001$), o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em 45,1%, e 47,4%; e o edema induzido por fenol em 32,2% ($p < 0.05$) e 37,4% ($p < 0.01$) respectivamente. Neste estudo não houve diferenças significativas entre o OELS ou o timol na redução do edema.

Em relação aos efeitos toxicológicos, verificou-se que a administração aguda do OELS até 3 g/kg, por via oral, em camundongos não apresentou toxicidade evidente, assim como a administração oral desse óleo (117,95 mg/kg/dia) em ratos por 30 dias não induziu alterações histológicas, hematológicas bioquímicas e séricas significativas (Fontenelle et al., 2007).

Estudos realizados por Oliveira et al., (2014) demonstraram que a aplicação tópica do OELS sobre a pele normal e lesada de camundongos ocasionou resposta irritante quando o óleo foi aplicado em concentrações elevadas (25, 50 e 100%); no entanto essa irritação foi leve quando OELS foi utilizado em baixas concentrações (12 e 6%), o que sugere que a dose de OELS deve ser controlada para uso externo. Em relação ao processo de cicatrização, a utilização contínua do OELS nas concentrações de 6 e 12% demonstrou intensificar a resposta inflamatória, porém não retardou o fechamento das lesões cutâneas. Em vista dos resultados os autores sugerem que OELS em concentrações adequadas pode ser

usadotopicamente como uma modalidade terapêutica alternativa para o tratamento de feridas cutâneas.

Monteiro e col. (2007) avaliou a atividade antioxidante (DPPH) do OELS contendo como constituintes majoritários timol (67%), e-cariofileno (12%), e p-cimeno (7%). Este estudo verificou que a concentração que inibe 50% do radical livre DPPH, IC₅₀ foi de 5,86 µg/mL para timol, e 7,27 µg/mL para OELS, e 0,4 µg/mL para eugenol (droga padrão antioxidante). Em outro estudo (Alves et al, 2003) foi avaliado a atividade antioxidante (DPPH) de quatro quimiotipos de OELS, contendo os compostos majoritários tipo I (timol 68,69%; p-cimeno 13,32%), tipo II (timol 68,40%; p-cimeno 10,56%), tipo III (timol 68,65 %, p-cimeno 10,49%) e tipo IV (timol 46,09%; p-cimeno 15,06%). Os resultados demonstraram que a dose de 40 mg/mL apresentou para tipo I IC₅₀ 2,46 mg/mL; tipo II 7,53 mg/mL, tipo III 10,94 mg/mL e tipo IV 8,40 mg/mL para o timol 12,40 mg/mL.

2.4 Avaliação do potencial antioxidante

Uma ampla variedade de métodos está disponível na literatura científica para mensurar a capacidade antioxidante de vários tipos de substâncias. O interesse em avaliar a capacidade antioxidante é resultado de vários estudos que apontam a importância de compostos antioxidantes na manutenção do equilíbrio de sistemas biológicos (Borges et al., 2011).

As técnicas para avaliar o potencial antioxidante de substâncias podem ser baseadas na detecção de produtos ou alterações fisiológicas ocasionadas pelo estresse oxidativo. Diferentes metodologias estão disponíveis possibilitando medições quali ou quantitativa, da capacidade antioxidante de substâncias, tanto através de testes químicos (sem utilização de células) ou testes biológicos (culturas celulares) (Alves et al, 2010; Derchette et al., 2013; Shahidi & Zhong, 2015).

O teste de DPPH• é um dos métodos indiretos mais antigos utilizados como triagem para avaliar a capacidade antioxidante em matérias primas naturais doadoras de hidrogênio (Borges et al., 2011). O método DPPH• é considerado fácil, altamente sensível, preciso, rápido, simples, econômico, tendo em vista que o radical DPPH• não precisa ser gerado pelo sistema, e a reação envolve somente o radical e o antioxidante (Kedare; Singh, 2011; Moon; Shibamoto, 2009).

O fundamento deste método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH•. O radical DPPH• possui coloração púrpura, sendo o comprimento de onda de máxima absorção aproximadamente 516 nm. Ao reagir com uma substância antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, que possui coloração amarela, gerando conseqüentemente decréscimo ou mesmo o desaparecimento da absorção, conforme a concentração e/ou atividade da substância avaliada. Estas alterações podem ser monitoradas e quantificadas através de espectrofotômetro UV/VIS (Oliveira et al, 2015).

A monitoração da diminuição da absorbância da reação entre a solução de DPPH• e uma amostra pode ser determinada como porcentagem de inibição, sequestro ou eliminação do radical DPPH•, que pode ser obtido pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}\bullet = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \times 100]$$

O método DPPH• ao longo dos anos sofreu muitas modificações e conseqüentemente diferentes protocolos foram desenvolvidos, o que compromete comparações de resultados de atividade antioxidante quando os protocolos não são os mesmos (Oliveira, 2015). Segundo os trabalhos de Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2006), os resultados de pesquisa da capacidade antioxidante de substâncias só devem ser comparados quando as medições foram feitas pelo mesmo procedimento, utilizando do mesmo tipo de solvente.

Segundo Moon & Shibamoto (2009), o método DPPH• é utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas. Porém avaliação da capacidade antioxidante não deve se basear apenas em uma única metodologia, sendo necessários outros métodos para caracterizar completamente um composto como antioxidante (Oliveira et al., 2015).

Tendo em vista que substâncias com ação antioxidante derivadas de produtos naturais assumem papel de destaque na medicina preventiva e curativa, é importante que a avaliação de sua atividade seja obtida também por metodologias que utilizem sistemas biológicos, de preferência os mais próximos possíveis do organismo humano (Shahidi & Zhong, 2015).

Neste contexto, ensaios em cultura de células representam uma boa opção pois se mostram adequados na triagem de vários produtos, são rápidos, sensíveis, reprodutíveis, econômicos e apresentam resultados confiáveis na identificação da atividade biológica (Wolfe, & Liu, 2007).

Nos últimos anos várias pesquisas têm utilizado o modelo de Quimioluminescência em neutrófilos para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias, principalmente derivadas de produtos naturais (Araujo-Lopes et al., 2013).

Quimiluminescência (QL) é um método importante para estudos em tempo real da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por fagócitos activados (Kopprasch, Pietzsch, Graessler, 2003).

O fenômeno da quimiluminescência consiste na emissão de luz por células fagocíticas quando estas ingerem microrganismos ou outras partículas. Este comportamento, é considerado um indicador sensível da atividade metabólica das células (Van Dyke, Castranova, 1987).

No entanto para medir a QL nativa das células é necessário equipamentos altamente sensíveis e um grande número de células polimorfonucleares (PMN). Visando otimizar a metodologia de mensuração da QL, sondas quimioluminescentes são adicionadas ao meio. Estas sondas são oxidadas pelas EROs produzidas durante a fagocitose, aumentando a quantidade de luz detectável (Easmon et al, 1980).

Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos constituem um importante componente de defesa inata do organismo contra patógenos e usualmente são as primeiras células a chegarem aos locais de infecção/inflamação (Di Stasi & Ley, 2009). Guiados por sinais químicos específicos, os neutrófilos migram para o sítio da infecção, onde exercem o papel de reconhecimento do agente estranho e fagocitose. A atividade microbicida é um processo dinâmico que gera gasto de energia e provoca alterações metabólicas, denominadas explosão ou surto (“burst”) respiratório (Dahlgren & Karlsson, 1999).

No processo de eliminação dos patógenos fagocitados, o neutrófilo utiliza procedimentos oxidativos, gerando a partir do sistema NADPH oxidase inicialmente o radical ânion superóxido, e depois uma série de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dahlgren & Karlsson, 1999; Sheppard et al, 2005).

O sistema NADPH oxidase dos neutrófilos representa um modelo essencial nas respostas imunológicas, porém também está envolvido no dano tissular associado a doenças inflamatórias (Francischetti et al., 2010). A ativação dos fagócitos pode ocorrer através de mecanismos mediados ou não por receptores (Babior, Lambeth, Nauseef, 2002). Dentre os estímulos dependentes de receptores pode-se destacar: complexos imunes formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), C5a, partículas de látex opsonizadas, zymosan opsonizado, bactérias opsonizadas. Entre os que independem de receptores estão o acetato de forbol miristato (PMA), os ionóforos de cálcio, diacilglicerol (DAG), entre outros (Sheppard et al., 2005).

O PMA (utilizado nesse trabalho) é um estímulo solúvel e não depende de receptores para a ativação de LPMN. Esse composto ativa a proteína quinase C (PKC), aumentando a atividade do shunt da hexose monofosfato, com consequente aumento do “burst” oxidativo pela ação da NADPH oxidase, produzindo ânion radical superóxido (Naccache *et al*, 1990; Sheppard et al., 2005)

2.5 Processo inflamatório

A inflamação é uma reação do organismo a algum tipo de injúria que ocorre em tecidos vascularizados, desencadeando uma série de processos bioquímicos e celulares. A injúria pode ser causada por disfunções genéticas ou imunológicas, traumas, agentes químicos, radiação ionizante, privação de oxigênio ou nutrientes, temperaturas extremas, entre outros (Flower & Perretti, 2005). Quando a injúria advém da invasão de microorganismos, passa a ser denominada infecção. O tecido danificado ativa vários mecanismos de defesa, incluindo células polimorfonucleares (leucócitos) e proteínas plasmáticas (imunoglobulinas, componentes do sistema complemento, opsoninas). Uma complexa variedade de mediadores vasoativos e quimiotáticos está envolvida neste processo (Kobayashi *et al*, 2003).

Os mediadores que são gerados no foco da inflamação/infecção amplificam a resposta local pelo recrutamento de células de defesa e componentes plasmáticos. Os processos de vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial facilitam o extravasamento de proteínas e células. Concomitantemente a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos é

ativada, promovendo migração ativa de leucócitos da circulação para o tecido inflamado (Rennen *et al.*, 2001).

Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos são componentes chave da resposta inflamatória, são eles os primeiros e mais abundantes a chegar ao foco da infecção. Como são os principais fagócitos circulantes vem sendo extensivamente utilizados em modelos para pesquisa da resposta inflamatória (DiStasi & Ley, 2009).

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemiproteína encontrada nos grânulos azurofilos dos neutrófilos, e representa importante papel na capacidade microbicida destes (Klebanoff et al., 2013). No entanto, em situações de intensa ativação celular, ocorre o excesso de atividade da MPO que pode ser prejudicial. A geração excessiva de oxidantes pela MPO está ligada ao dano tecidual em muitas doenças, especialmente aquelas caracterizadas pela inflamação aguda e crônica (Klebanoff, 2005).

Estudos recentes demonstraram que a MPO ao ligar-se as beta – 2 integrinas (CD11b/CD 18) nos neutrófilos, induzem a uma cascata de reações intracelulares, levando a um aumento na degranulação de neutrófilos, na expressão de beta-2 integrinas e na atividade de NADPH oxidase, estimulando as vias de ativação destas células através de um mecanismo independente da atividade catalítica da MPO. Estas propriedades de MPO a caracterizam além de sua atividade bactericida e enzimática, como um mediador pro-inflamatório (Klebanoff, 2005; Klebanoff et al., 2013).

2.6 Modelos animais de inflamação

No ano de 1865 o pesquisador Claude Bernard lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana, onde buscou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina (Fagundes & Taha, 2004).

A experimentação animal consiste em qualquer prática que faz uso de animais para fins didáticos ou de pesquisa, correspondendo a qualquer procedimento, invasivo ou não (Stefanelli, 2011). O uso experimental de animais representa um importante instrumento que corrobora para a elucidação dos

fenômenos clínicos, de modo a transpor a partir do plano animal as respostas fisiológicas esperadas para o humano, buscando representar nos modelos animais, situações clínicas humanas com intuito de compreendê-las e exercer controle sobre elas (Castro-Costa; Santos; Castro-Costa, 2009).

Vários modelos animais são utilizados na pesquisa de compostos com atividade anti-inflamatória, nestes a estereotipia da gênese dos sinais e sintomas da inflamação servem de base para a caracterização farmacológica de novos compostos, incluindo aqueles extraídos de plantas para o ensaio de novos candidatos a fármaco, avaliando-se a resposta do composto em relação ao edema, alteração da permeabilidade vascular, migração leucocitária e nocicepção (Lapa et al., 2007).

O óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) é uma substância irritante utilizada para induzir edema em orelha de camundongos, em modelo para pesquisa da atividade anti-inflamatória tópica de novos compostos. Mas responde também à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais (Lapa et al., 2007). Um dos componentes responsáveis pela ação irritante do óleo de cróton, o TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), é reportado como modelo experimental para indução de dermatite de contato irritativa em animais (Recio, 2000). A fisiopatogenia do edema induzido pelo, TPA parece ser exercida entre outros mediadores, pelos produtos da ciclooxygenase, histamina e serotonina (Lapa et al., 2007).

2.7 Dermatites

A Dermatite Atópica (DA) é uma manifestação inflamatória da pele de caráter crônico, recidivante, com evolução em surtos, predominante na infância, tendo como principal sintoma o prurido de intensidade variável e como sinais, a xerose cutânea e lesões de padrão eczematoso (Williams, 2005, Sehra et al 2008). Esta dermatose afeta crianças e adultos ocasionando um alto custo social com importante taxa de morbidade, pois altera significativamente a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares (Sanz , 2000).

Considerada a mais freqüente doença inflamatória crônica da pele, sua prevalência tem aumentado de forma constante, afetando de 10%-20% dos lactentes e 1%-3% dos adultos em todo o mundo (Sap Rivitti Ea., 2007, ONG, 2009). Cerca de 60% dos casos da doença manifestam-se pela primeira vez antes do

primeiro ano de vida e, em 90 % dos casos, antes dos 5 primeiros anos (Maciel, 2001). No censo realizado pela sociedade brasileira de dermatologia a DA ocupou 2º lugar em prevalência, em pacientes de até 14 anos de idade e 11º lugar na população em geral, mostrando que é uma dermatose bastante comum (Kobata, 2010).

A etiopatogenia da DA atópica é complexa e multifatorial. Predisposição genética, alteração da barreira cutânea, colonização da pele por *Staphylococcus aureus*, alteração da fosfodiesterase, disfunção do sistema imunológico, fatores psicológicos e ambientais estão entre os principais elementos envolvidos no desencadeamento desta doença (LEUNG, 2001).

A “atopia” pode ser considerada uma predisposição hereditária do sistema imune a privilegiar reações de hipersensibilidade mediada por IgE, em resposta a antígenos comuns na alimentação, e no ambiente. Este conceito situa a dermatite atópica como uma das manifestações das doenças da tríade atópica (dermatite atópica, asma, rinite alérgica) (Leite. Leite, Costa, 2007).

Descrições recentes questionam a existência de duas formas de dermatite atópica: uma extrínseca ou alérgica, associada a doenças respiratórias e susceptível a fatores ambientais, como a dieta; e outra denominada intrínseca (ou não alérgica), sem associação com as doenças atópicas respiratórias e não relacionada a fatores ambientais, como a alimentação. Essa subdivisão da dermatite atópica, baseada em critérios científicos clínicos e imunológicos rígidos, parece ser enfim um caminho de consenso para as dúvidas milenares a respeito da dermatite atópica (Wuthrich & Schmid-Grendelmeier, 2002; Leite; Leite; Costa, 2007).

Na dermatite atópica, evidencia-se a degranulação contínua e/ou intermitente dos mastócitos, os quais liberam histamina, prostaglandina D2, leucotrienos C4, D4 e E4, que provocam eritema, edema, vasopermeabilidade e quimiotaxia de leucócitos (Paschoal, 2001).

Os pacientes com dermatite atópica têm uma propensão singular a infecções por uma série de microrganismos. As lesões da dermatite atópica são complicadas por infecções de repetições ocasionadas por bactérias, vírus e fungos (Abramovits & Perlmutter, 2006). Foi demonstrado que infecções por dermatófitos ocorrem mais em pacientes atópicos, e que a recorrência dessas infecções coincide com a piora da DA (Kobata, 2010).

A colonização da pele por *Staphylococcus aureus* nas áreas afetadas pela dermatite atópica (figura 9) é comum e está relacionada ao desencadeamento dos surtos (Williams; et al, 2004). Mais de 90% dos pacientes com DA possuem *S. aureus* na pele, enquanto somente 5% da população normal sem DA está colonizada por essa bactéria. Além do dano físico, pacientes portadores de DA podem atuar como reservatórios deste microorganismo e transmiti-lo a pessoas saudáveis. Uma das explicações para que o *S. aureus* exacerbe e mantenha a inflamação na pele do atópico é a secreção de superantígenos que estimulam a ativação massiva de células T e macrófagos (Kobata, 2010).

Figura 9 - Criança com dermatite atópica infectada por *S. aureus*



Fonte: Boguniewicz, 2010

A dermatite atópica é uma doença que afeta não somente a qualidade de vida dos pacientes, mas também a dos seus familiares, podendo muitas vezes acarretar em efeitos psicológicos em adolescentes. Em vista disso cresce a importância de se pesquisar uma terapia potencial que seja segura e eficaz para atender as necessidades desta demanda (FERREIRA, 2007).

A Dermatite de Contato é uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados e constitui uma das doenças ocupacionais mais comuns (SAINT-MEZARD et al., 2004). A capacidade do indivíduo desenvolver dermatite de contato está relacionada a interação de fatores genéticos e imunológicos e da sua exposição a substâncias sensibilizantes ou irritantes (KOBATA, 2010).

De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de dermatite de contato: a Dermatite de Contato Irritativa (DCI) que é decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de

ativar a imunidade inata da pele; e a Dermatite de Contato Alérgica (DCA) que requer a ativação da imunidade adquirida antígeno-específica levando à ativação de células T efectoras, mediadoras da inflamação cutânea, e é caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação (ENGLISH, 2004).

2.7.1 Farmacoterapia da Dermatite

Até o presente momento os tratamentos das dermatites disponíveis se baseiam em medidas paleativas visando controlar os sintomas. O tratamento clássico inclui hidratação da pele, corticoterapia tópica, imunomoduladores, bloqueadores de calcineurina e uso oral de antihistamínicos (RANCE, 2005)

Os hidratantes ou cremes são em geral utilizados em quadros subagudos (LODEN, 1991), exercendo o seu efeito por atrair água, aumentando a hidratação da pele (LODEN, 1997).

Os corticosteróides representam a base do tratamento farmacológico, são considerados efetivos e bem tolerados para uso em curto prazo. Porém os efeitos adversos limitam o uso prolongado dessas medicações, e os esteróides potentes são contra-indicados para uso na face e áreas intertriginosas. Os efeitos adversos locais incluem atrofia cutânea, hipopigmentação, estrias, infecções secundárias e foliculite. A utilização em extensa área corpórea ou sob oclusão pode resultar em significativa absorção sistêmica. As crianças são particularmente suscetíveis aos eventos adversos sistêmicos, como supressão do eixo hipotálamo-hipófiseadrenal, doença de Cushing e osteonecrose da cabeça do fêmur (GONTIJO et al., 2008; FISHER, 1995).

Vale salientar que a farmacoterapia atual não tem proporcionado uma resposta uniforme e eficaz em todos os pacientes, o que tem levado alguns a optar por tratamentos baseados na medicina complementar. Uma revisão realizada por (Chacha *et al.* 2009)

Enfim, diante do exposto a pesquisa de novos fármacos que combinem as atividades antiinflamatória, imunomodular, antimicrobiano e que apresentem menos efeitos indesejáveis em relação a farmacoterapia atual, é atrativo para o tratamento de doenças da pele como a dermatite. Nesse contexto, a biodiversidade

em particular as plantas medicinais pode ser uma fonte de novos medicamentos de interesse sócio-econômico-ambiental. Inclusive, vários estudos têm mostrado o potencial antiinflamatório e imunomodulador de produtos naturais, como óleo essencial de *Chamomilla recutita* (Lee; Heo; Kim, 2010), a fisalina de *Physalis angulata* (PINTO et al., 2010) e o extrato de *Evodia rutaecarpa* (Yarosh et al.,2005) em modelos experimentais de dermatite.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade biológica de nanocápsulas poliméricas utilizando como ativo o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

3.2 Objetivos específicos

- ∅ Realizar caracterização da droga vegetal, e do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS);
- ∅ Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do OELS, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD);
- ∅ Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *L. sidoides* (NCLS);
- ∅ Validar metodologia para doseamento das NCLS por CLAE-DAD;
- ∅ Caracterizar as NCLS desenvolvidas quanto ao tamanho, polidispersão, potencial zeta, morfologia, teor, eficiência de encapsulação, comportamento térmico (calorimetria exploratória diferencial - DSC), e propriedades vibracionais (micro-Raman);
- ∅ Realizar estudos preliminares de estabilidade das NCLS;
- ∅ Avaliar a atividade antimicrobiana do OELS e das NCLS sobre *Staphylococcus aureus*;
- ∅ Investigar a toxicidade avaliando o efeito do OELS, TIMOL e NCLS em neutrófilos humano mensurado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT;
- ∅ Avaliar o potencial anti-inflamatório tópico das NCLS em camundongos;
- ∅ Avaliar os efeitos do OELS e do timol, sobre o metabolismo oxidativo induzido por PMA em neutrófilos, empregando a técnica de Quimioluminescência;
- ∅ Avaliar a atividade antioxidante/sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das NCLS e OELS.

Material e métodos

4. MATERIAL E MEDODOS

4.1 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal

4.1.1 Material botânico

A espécie *L. sidoides* foi cultivada e coletada do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará (UFC) Prof. F.J.A. Matos, Campus do Pici, Fortaleza. As folhas de *L. sidoides* foram coletadas pela manhã, no horário entre 8:00 e 9:00h em outubro de 2012. Foram preparadas exsicatas das plantas coletadas, sendo as mesmas depositadas no Herbário Prisco Bezerra da UFC.

4.1.2 Determinação do tempo de secagem

As folhas de *L. sidoides*, após coleta foram lavadas em água corrente, e submetidas à secagem em estufa com renovação de ar (TE-394/2- Tecmal) à temperatura de 40°C. O tempo adequado para secagem da droga vegetal foi determinado recolhendo alíquotas de 2 g de folhas contidas na estufa, após 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de secagem, e analisadas em balança acoplada a sistema de irradiação por infravermelho (Marte, Brasil). Os resultados obtidos em perda de massa percentual foram expressos como média e coeficiente de variação (%) da análise de três amostras. A seleção do tempo ideal para secagem foi definida com base nos valores de umidade apresentados.

4.1.3 Análise granulométrica

Após a secagem a droga vegetal constituída de folhas de *L. sidoides* foi submetida à redução do tamanho de partículas em moinho de facas (Moinho MA 048 Marconi, Brasil). Sendo realizado ensaio para determinação da granulometria do pó. O método adotado foi de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª ed (Brasil, 2010 a), sendo o equipamento utilizado um tamisador automático (Produtest, Brasil) em vibração 3 durante 15 minutos. Os tamises utilizados no ensaio foram ABNT 10, 25, 45, 60, 80 e 120. Ao primeiro tamis foi adicionado a quantidade de 100 g da

droga pulverizada, e após o término da vibração foram calculados a porcentagem de droga retida nos tamises pela equação:

$$\text{Retenção da droga (\%)} = \frac{M1_{(g)}}{M2_{(g)}} \times 100$$

Onde: $M1_{(g)}$ = massa retida no tamis em gramas

$M2_{(g)}$ = massa da droga total pesada em gramas

4.1.4 Determinação da umidade (teor de água) na droga pulverizada

A umidade do pó de *L. sidoides* foi determinada através de dois métodos: gravimétrico e volumétrico. Para o método gravimétrico foi utilizado analisador de umidade (Marte ID50, Brasil), equipado com fonte de calor infravermelho revestida em quartzo, sensibilidade da balança 0,001g, massa da amostra 2 g, temperatura de análise 105°C, e tempo de análise 30 minutos. Para o método volumétrico, que consiste em titulação azeotrópica, foi utilizado um aparelho Karl Fisher® Schott Titroline, titulação simples, no qual o iodo é dissolvido na solução titulante e o teor de umidade é determinado pela quantidade de iodo consumida na reação com a água presente na amostra. As análises foram realizadas em triplicata para ambos os métodos.

4.1.5 Teor de cinzas: totais e insolúveis em ácido

A metodologia adotada para determinação de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido nas folhas pulverizadas de *L. sidoides*, seguiu metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª ed (Brasil 2010). A quantidade exata de 2 g por amostra foi transferida para cadinho de porcelana, previamente pesado, sendo em seguida incinerada e submetida a aquecimento em forno mulfa a temperatura de 400°C por uma hora e após a 600°C por 3 horas. As amostras foram resfriadas em dessecador, e então foi calculada a porcentagem de cinzas totais em relação à droga seca. Para determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido, as amostras deste ensaio foram fervidas com 25 mL de ácido clorídrico a 7%, e após, recolhidas

em papel de filtro isento de cinzas, lavadas com água até retirada completa do resíduo de ácido e incineradas em forno mufla a 500°C até peso constante.

4.1.6 Teor de óleo essencial

O teor de óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) foi determinado através de hidrodestilação. A quantidade de 25 g da droga vegetal pulverizada (pó grosso), foi colocada em balão de fundo redondo de capacidade de 500 mL, sendo adicionado 300 mL de água destilada. Procedeu-se a extração do óleo essencial em aparelho de clewenger por 4 horas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.1.7 Teor de extrativos em etanol

O teor de substâncias extraíveis por etanol foi determinado segundo metodologia da Farmacopeia Brasileira 5ªed. Foi transferido exatamente 4,0 g da amostra vegetal pulverizada para um erlenmeyer de 250 mL, com boca esmerilhada. A este foi adicionado o volume de 100 mL de etanol absoluto e a mistura foi mantida em maceração por um período de 6 h, mantendo agitação frequentemente (agitador magnético - Quimis, mod, 261-2), e após, foi deixada em repouso por 18 h. Decorrido o tempo o extrato obtido foi filtrado a vácuo, e em seguida uma amostra do filtrado com o exato volume de 25 mL foi transferida para uma cápsula de porcelana tarada, e o líquido levado à evaporação até secura em banho de água. As análises foram realizadas em triplicata e os cálculos de rendimento foram realizados de acordo com a equação abaixo (Brasil, 2010).

$$\text{Teor de extrativos em etanol (\%)} = \frac{M1_{(g)}}{M2_{(g)}} \times \text{FD} \times 100$$

Onde: M1 = massa do resíduo do macerado

M2 = massa de droga antes da maceração

FD = fator de diluição

4.1.8 Prospecção fitoquímica

Foi realizado ensaio de prospecção fitoquímica para identificar no material vegetal as principais classes de metabólitos secundários. Os ensaios realizados seguiram metodologia descrita por Matos, 2009. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Foram pesquisados a presença de: saponinas, taninos, alcalóides, heterosídeos flavônicos, heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos digitálicos e heterosídeos antociânicos.

4.2 Caracterização química do OELS por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

Análise dos constituintes do OELS foi realizada no laboratório de cromatografia gasosa do departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi utilizado um aparelho SHIMADZU QP5050, com as seguintes condições experimentais: coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), gás de arraste: Hélio:1,7 mL/min, velocidade linear 47,4 cm/sec, razão de Split: 27, fluxo total: 50.0 mL/min, temperatura inicial 25°C, temperatura da interface 230°C. Os componentes foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão, existentes na biblioteca Wiley do sistema. Os IR foram obtidos utilizando a série homóloga dos n-alcanos.

4.3 Validação de metodologia analítica para doseamento de timol em óleo essencial de *L. sidoides* e em nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides* por CLAE-DAD

A metodologia para quantificação de timol em OELS e em NCLS foi validada segundo as diretrizes do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos RE 889/2003 (Brasil, 2003). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, intervalo, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

a) Reagentes e solventes

Foi empregado como padrão externo o timol (99,5% pureza) adquirido da Sigma Aldrich[®]. Para o preparo da fase móvel foi utilizado o solvente acetonitrila grau HPLC adquirido da Tedia (Rio de Janeiro, BR), e água purificada através de sistema de filtração mili-q (Milipore).

b) Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters Alliance 2695, USA), com detector de arranjo de diodos (Waters Alliance 2996, USA), utilizando coluna cromatográfica ODS Hypersil C-18 (Thermo) de 250 mm x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula, e pré-coluna C-18 (Thermo) 10 x 4 mm. O ponto de partida para quantificação do marcador timol no OELS e em NCLS, foi um método desenvolvido pelo grupo de pesquisa do CEFAC para determinação de timol em tintura obtida de folhas de *L. sidoides* (Leal *et al.*, 2003). As condições experimentais adotadas foram temperatura da coluna 40°C, fase móvel acetonitrila : água (78:22), eluição em modo isocrático, fluxo de 0,8 mL/min, comprimento de onda de detecção 278nm, volume de amostra injetado 20 µL, e tempo de corrida 8 min. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

c) Preparo das soluções padrão e amostras

Para quantificação do marcador timol foi obtida uma curva de calibração utilizando 7 concentrações do padrão (4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 180 µg/mL). Inicialmente foi pesado 10 mg de timol em balança analítica (Toledo, Brasil), transferido para balão volumétrico de 10 mL, e completado o volume com a fase móvel. A partir desta solução de timol (1 mg/mL), foram preparadas as demais diluições da curva de calibração.

As amostras de OELS foram preparadas pesando cerca de 20 mg de OELS diretamente em balão volumétrico de 10 mL, utilizando balança analítica (Toledo, Brasil), o volume do balão foi completado com a fase móvel. A partir desta solução (2 mg / mL de OELS), foram preparadas diluições de 16 - 24 µg/mL de

OELS, para os ensaios de validação, e diluição de 20 µg/mL para os ensaios de quantificação do OELS ao longo do estudo.

As amostras de NCLS, ou nanocápsulas branco (NB) foram preparadas adicionando-se conforme a análise, quantidades de 80-120 µL da suspensão de nanocápsulas em balão volumétrico de 10 mL e completando o volume com a fase móvel, desta forma as diluições de nanocápsulas consistiram em 8 – 12 µL/mL.

As soluções padrão e amostras foram sempre preparadas no mesmo dia das análises, filtradas em unidade filtrante com poro de 0,45 µm (Milipore, EUA) e transferidas para *vial* para injeção no equipamento.

4.3.1 Especificidade

Segundo a RE 899/2003 especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto, em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003).

Desta forma o ensaio para avaliar a especificidade do método para quantificar timol no OELS contido nas NCLS, consistiu em avaliar se a matriz das nanocápsulas, ou seja, seus constituintes interferiam na análise.

O procedimento consistiu em submeter à análise cromatográfica separadamente, o padrão timol, o OELS, a formulação de nanocápsulas sem adição de OELS (NCB), e a formulação de nanocápsulas contendo o OELS (NCLS). Após a corrida cromatográfica os cromatogramas foram comparados a fim de investigar os tempos de retenção referentes ao pico de timol se mantinham inalterados nas três amostras, e também se havia algum pico no cromatograma da matriz (NCB) que pudesse interferir na análise de timol nas NCLS.

4.3.2 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi avaliada através da resposta do detector a diferentes concentrações do padrão timol, do OELS e de NCLS.

Para o padrão timol foram construídas três curvas analíticas contendo 7 níveis de concentração cada, abrangendo o intervalo de 4-180 µg/mL de timol (4

$\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 180 $\mu\text{g/mL}$) em cada nível as amostras eram preparadas em triplicata.

Para o OELS e NCLS foram avaliadas três curvas contendo 5 níveis de concentração correspondentes ao intervalo de 80, 90, 100, 110 e 120% da concentração teórica do teste. Desta maneira foram preparadas diluições de OELS contendo 16 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 22 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$, e diluições de NCLS contendo 8 $\mu\text{L/mL}$, 9 $\mu\text{L/mL}$, 10 $\mu\text{L/mL}$, 11 $\mu\text{L/mL}$ e 12 $\mu\text{L/mL}$. Em cada nível as amostras eram preparadas em triplicata.

Vale ressaltar que cada 1 μg de OELS corresponde em média a 0,6 μg de timol, e que cada 1 μL de NCLS corresponde a aproximadamente 3,2 μg de timol, assim todas as concentrações tanto de NCLS como de OELS estão dentro do intervalo de concentração da curva de calibração de timol.

Os resultados foram processados em planilhas do Microsoft Excel[®], a representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As áreas dos picos utilizados na determinação analítica foram estatisticamente avaliadas pelo ensaio de variância (ANOVA).

4.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nos dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média, obtidos a partir das três curvas analíticas do padrão timol (Ribeiro, 2008).

4.3.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída ou repetibilidade) e em corridas diferentes (precisão inter-corrídas ou precisão intermediária). Os resultados foram expressos em porcentagem de teor nominal onde para o OELS, 100% de teor corresponde a concentração de timol de 600 mg/mL , e para as NCLS, 100% de teor corresponde a concentração de timol de 3,2 mg/mL .

4.3.5 Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade consistiu em preparar 6 amostras de OELS ou NCLS nas concentrações de 20 µg/mL e 10 µl/mL respectivamente, correspondentes a 100% da concentração teórica do teste. Estas 6 amostras foram preparadas pelo mesmo analista no mesmo dia, utilizando a mesma instrumentação e injetadas no equipamento.

4.3.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi verificada através da avaliação de três concentrações de OELS ou NCLS, correspondentes a 80, 100 e 120% da concentração teórica, que equivale a diluições de 16 µg/mL, 20 µg/mL e 24 µg/mL para o OELS, e 8 µl/mL, 10 µl/mL e 12 µl/mL para NCLS. Cada concentração foi preparada em triplicata. Estas soluções foram preparadas em dois dias diferentes por dois analistas diferentes, conforme representado na tabela 1.

A igualdade das variâncias foi avaliada pelo teste F e os resultados expressos pelo desvio padrão relativo (DPR), não podendo este assumir valores acima de 5% (Brasil, 2003).

Tabela 1 - Protocolo experimental para verificação da precisão intermediária

Dia	Analista 1	Analista 2
1	80, 100, 120%	80, 100, 120%
2	80, 100, 120%	

4.3.7 Exatidão/Recuperação

A exatidão ou recuperação foi determinada utilizando o método de adição de padrão, que consiste em adicionar a amostra quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) em três níveis de concentração (baixa media e alta),

obedecendo o intervalo de linearidade do método e comparar os resultados obtidos com as mesmas concentrações do padrão de referência.

Desta forma foram preparadas três concentrações do padrão timol, três concentrações de OELS adicionado do padrão timol, e três concentrações da formulação NB adicionada do padrão timol conforme descrito na tabela 2:

Tabela 2 - Protocolo experimental para preparo das soluções utilizadas na verificação da exatidão

Concentração	Soluções de Timol	Soluções de OELS + timol	Soluções de NB + timol
10 (baixa) µg/mL	Transferir 100 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL e completar o volume com fase móvel	Transferir 50 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 83 µL de sol. estoque de OELS (1mg/mL) e completar o volume com fase móvel	Transferir 100 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 100 µL de suspensão de NB e completar o volume com fase móvel
50 (média) µg/mL	Transferir 500 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL e completar o volume com fase móvel	Transferir 250 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 416 µL de sol. estoque de OELS (1mg/mL) e completar o volume com fase móvel	Transferir 500 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 500 µL de suspensão de NB e completar o volume com fase móvel
100 (alta) µg/mL	Transferir 1000 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL e completar o volume com fase móvel	Transferir 500 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 832 µL de sol. estoque de OELS (1mg/mL) e completar o volume com fase móvel	Transferir 1000 µL de sol. estoque de timol (1mg/mL) para balão vol. de 10mL, adicionar 1000 µL de suspensão de NB e completar o volume com fase móvel

Os resultados da exatidão foram expressos através da relação entre a concentração média da solução adicionada do padrão pela concentração correspondente da solução do padrão, conforme a equação:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração de OELS ou NB + timol}}{\text{concentração de timol}} \times 100$$

4.3.8 Robustez

A robustez foi avaliada pela variação dos parâmetros temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e fabricante da coluna, conforme descrito na tabela 3. Foram avaliadas as colunas C18 (250 mm x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula) das marcas Thermo e Fenomenex. Foram avaliadas amostras correspondentes a 100% da concentração teórica do teste, ou seja o OELS na diluição de 20 µg/mL de fase móvel. Os resultados foram expressos em porcentagem de teor nominal onde 100% de teor corresponde a 600mg de timol em cada mL de OELS. Para análise estatística foi aplicando o teste de variância ANOVA seguido do teste de Tukey, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados na verificação da robustez

Método padrão		Condições desafio		
		1	2	3
Temperatura	40°C	30°C	40°C	40°C
Coluna marca	Termo	Thermo	Fenomenex	Thermo
Fluxo (ml/min)	0,8	0,8	0,8	1,0

4.4 Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *L. sidoides* (NCLS)

4.4.1 Método de preparo das formulações

As nanocápsulas foram obtidas através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Este método consistiu em

aquecer separadamente uma fase orgânica (composta de fosfatidilcolina, PLGA, OELS e acetona) e uma fase aquosa (contendo poloxamer 407 e água mili-Q) a mesma temperatura ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$), e injetar com auxílio de uma seringa a fase orgânica na fase aquosa sob agitação magnética (Quimis 601.2, Brasil), mantendo a agitação e aquecimento por 5 minutos após a incorporação das fases. Em seguida solvente e excesso de água foram removidos sob pressão reduzida em rotaevaporador (Heidolph G3, Alemanha), a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a formulação concentrada até volume final de 20 mL.

4.4.2 Desenvolvimento da formulação

O desenvolvimento da formulação de nanocápsulas consistiu em duas etapas. Na primeira etapa foram produzidas nove formulações sem adição do polímero de revestimento PLGA. O intuito deste ensaio foi definir as concentrações de tensoativo lipofílico (fosfatidilcolina) e hidrofílico (poloxamer 407) a serem utilizadas no sistema. A composição quali e quantitativa das formulações desenvolvidas na primeira etapa estão descritas na tabela 4. Estas formulações foram avaliadas após 1 e 20 dias do preparo quanto aos parâmetros tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Tabela 4 - Composição das formulações da primeira etapa do desenvolvimento de nanocápsulas

Formulações	OELS (uL)	Fosfatidilcolina (mg)	Acetona (mL)	Poloxamer (mg)	Água (mL)
LS-1	150	60	15	120	25
LS-2	150	90	15	120	25
LS-3	150	120	15	120	25
LS-4	150	60	15	180	25
LS-5	150	90	15	180	25
LS-6	150	120	15	180	25
LS-7	150	60	15	240	25
LS-8	150	90	15	240	25
LS-9	150uL	120	15	240	25

Todas as formulações foram concentradas para volume final de 20 mL

As formulações que apresentaram menor tamanho de partícula e distribuição mais estreita (menor índice de polidispersão e curva unimodal), e que se mantiveram estáveis por 20 dias, foram selecionadas para a segunda etapa do desenvolvimento que consistiu em adicionar o polímero lipofílico PLGA nas concentrações de 36 mg e 72 mg na formulação. Nesta segunda etapa a formulação que apresentou melhores características quanto ao tamanho e índice de polidispersão foi selecionada para prosseguir nos ensaios de caracterização.

4.5 Caracterização das nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides* (NCLS)

4.5.1 Análise do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz

O diâmetro hidrodinâmico das partículas coloidais foi determinado empregando-se a espectroscopia de fotocorrelação por espalhamento dinâmico de luz. Decorrido 24 horas do preparo, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 em água ultrapura por osmose reversa (sistema Milli-Q) e introduzidas em cubetas apropriadas para leitura de tamanho. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações realizadas a 25°C em equipamento ZetaSizer (NanoZS 6.32 Malvern). Além da distribuição de tamanhos de partículas, foi registrado também o índice de polidispersão para um coeficiente de correlação de no mínimo 10^5 .

4.5.2 Determinação do potencial zeta

Decorrido 24 horas do preparo, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 em água ultrapura por osmose reversa (sistema Milli-Q), e introduzidas em cubetas apropriadas para leitura de potencial zeta. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações realizadas a 25°C em equipamento ZetaSizer (NanoZS 6.32 Malvern).

4.5.3 *Análise morfológica das nanocápsulas através de microscopia de força atômica (AFM)*

Foram utilizados os equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos controlados por controlador nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara EUA). As imagens foram obtidas no modo contato intermitente com sondas de silício (122-228µm e frequência de ressonância de 297-380 Khz e 75-98 Khz). Uma amostra de 10 µL da suspensão de nanocápsulas foi depositada em mica clivada no momento do uso, e seca a temperatura ambiente (25°C). As imagens foram processadas no software do próprio equipamento.

4.5.4 *Doseamento - Quantificação do marcador timol em nanocápsulas de L. sidoides*

4.5.4.1 Condições cromatográficas:

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters Alliance 2695, USA), com detector de arranjo de diodos (Waters Alliance 2996, USA), coluna cromatográfica C18 (Thermo ODS Hypersil) 4,6 mm x 250mm x 5µm e pré-coluna C-18 (Thermo) 10 x 4 mm, temperatura da coluna 40°C. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura de 78% de acetonitrila e 22% de água, em modo isocrático. As análises foram realizadas no modo varredura na faixa de 210 a 390 nm, o volume injetado no equipamento foi 20 µL.

4.5.4.2 Preparo das amostras:

Padrão: 10 mg de timol foi transferido para balão volumétrico de 10 mL sendo o volume completado com fase móvel (acetonitrila/água 78:22). A partir desta solução foram feitas diluições para construção de uma curva de calibração de 7 pontos com concentrações de 4 a 180 µg/mL. As amostras de padrão foram filtradas em unidade filtrante com 0,45 µm de poro e transferidas para *vial* para injeção no equipamento.

Amostra de nanocápsulas: A quantidade de 100 µL da suspensão de nanocápsulas foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com fase móvel (acetonitrila/água 78:22). A amostra foi então filtrada em unidade filtrante com 0,45 µm de poro e transferida para *vial* para injeção no equipamento. As análises foram realizadas em triplicata.

4.5.5. Avaliação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação, ou seja, a concentração de ativo associado nas nanoestruturas foi determinada através do doseamento de timol total no ultrafiltrado de nanocápsulas (Santos et al., 2013). A fase aquosa externa da suspensão foi separada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação utilizando unidades filtrantes Microcon[®] marca Millipore com membrana de 10.000 Da. A quantidade de 2 mL da amostra de nanocápsulas foi transferida para as unidades filtrantes, e então centrifugadas a 3.000 rpm por 30 minutos (análise em triplicata). O volume de 1 mL do ultrafiltrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e seu volume foi completado com fase móvel (acetonitrila/água 78:22). Esta solução foi filtrada em unidade filtrante com poro de 0,45µm e transferida para *vial* para posterior leitura no equipamento. O doseamento do marcador timol foi realizado por CLAE-DAD. A porcentagem de timol que permaneceu encapsulado nas nanocápsulas foi determinado pela seguinte equação, onde “EE%” é a eficiência de encapsulação em porcentagem, e “A” representa a quantidade de ativo/mL:

$$EE\% = \frac{A \text{ (total na formulação)} - A \text{ (no ultrafiltrado)}}{A \text{ (total na formulação)}} \times 100$$

4.5.6 Estudo termoanalítico: Análise térmica por DSC

Com o objetivo de caracterizar o sistema e avaliar possíveis interações entre os componentes da formulação, foram submetidos a ensaio termoanalítico por calorimetria exploratória diferencial (DSC) os excipientes das nanocápsulas (poloxamer, fosfatidilcolina, PLGA), o componente ativo (OELS), misturas 1:1 do

ativo e excipientes, mistura física de todos os componentes, e a suspensão de nanocápsulas.

Os termogramas foram obtidos através do equipamento DSC-50 da SHIMADZU, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min; razão de aquecimento de 8°C/min, de 25 até o 500°C; cápsula de alumínio para amostras sólidas e semissólidas, conforme o material a ser analisado, e massa de amostra em torno de 2,0 mg. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99%. Para a quantidade de calor empregou-se o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio metálico (28,7 Jg⁻¹).

4.5.7 Caracterização quanto as propriedades vibracionais: Análise por microscopia Raman

As propriedades vibracionais dos componentes isolados e das formulações dos nanosistemas (nanocápsulas e nanoemulsão), foram avaliadas utilizando equipamento micro-Raman modelo LabRAM Jobin-Yvon HORIBA, equipado com um dispositivo de carga acoplado (charge-coupled device – CCD), resfriada com nitrogênio líquido. Para excitação das amostras utilizou-se um laser de argônio operando com 784,8 nm de comprimento de onda e 68 mW de potência. O feixe de laser foi focalizado na superfície da amostra utilizando uma lente de microscópio Nikon (50x) distância focal de 20,5 mm e abertura numérica de 0,35.

Procedimento experimental: Antes das análises o equipamento foi calibrado com uma pastilha de silício ajustando o pico para 521 cm^{-1} . Amostras de cada componente isolado das nanocápsulas (poloxamer, PLGA, fosfatidilcolina e OELS), foram colocados cada um em uma lâmina de vidro de microscopia e levados ao micro-Raman. Cerca de 20 μL das amostras de NCLS, NCB, NELS e NEB foram colocadas cada uma sob uma lamina de vidro e deixadas secar a temperatura ambiente, este procedimento foi repetido três vezes a fim de concentrar a amostra sob a lâmina e permitir que o microscópio captasse o foco do filme formado. Os parâmetros do equipamento consistiram em: abertura de fenda de 100 μm , tempo de aquisição de 30 segundos, grade de 600, análise no modo multimode de 200 a 4000

cm⁻¹. O controle e aquisição dos dados foi obtido através de computador acoplado ao espectrômetro operando com o software LabSpec5.

4.6 Estudos preliminares de estabilidade das NCLS

4.6.1 Análise macroscópica das formulações

As formulações desenvolvidas foram analisadas 24 horas após o preparo (estabilidade intrínseca). Durante este período foram acondicionadas em frascos transparentes a fim de facilitar a análise visual. Na análise macroscópica foram observadas as características de aparência, coloração, homogeneidade, pesquisando possíveis processos de separação de fases.

4.6.2 Avaliação da estabilidade das nanocápsulas

A formulação de nanocápsulas foi submetida ao estudo de estabilidade durante um período de 360 dias. A estabilidade das amostras acondicionadas em frasco de vidro transparente (3 replicas) foi avaliada a temperatura ambiente (25°C±2), pelo monitoramento dos parâmetros tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão, pH e teor do marcador timol nos tempos 1, 30, 60, 90, 120, 180 e 360 dias.

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana do OELS e das NCLS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

4.7.1 Preparo das amostras

As formulações de NCLS, NCB (nanocápsulas sem adição do OELS) e o OELS foram diluídos, separadamente, em água ultra pura (NCLS e NCB), ou em solução de tween 80 a 1% (OELS), nas concentrações de 0,1367; 0,2734; 0,5468; 1,0937; 2,1875; 4,375; 8,75; 17,5; 35; 70; 140 e 280 µg/mL e mantidas sob proteção da luz e refrigeração (-20°C), até o momento do ensaio. As diluições de NCLS foram preparadas de modo a obter concentrações equivalentes em OELS.

4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) das amostras para a cepa de *S. aureus* ATCC 6538P foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de cultura de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI/2009, utilizando microplacas com 96 poços de fundo redondo, estéreis e com tampas apropriadas (Edition, 2009).

Colônias isoladas de *S. aureus* foram ativadas por incubação a 37°C, overnight, em caldo BHI, e incubadas até atingirem fase exponencial de crescimento (4 – 6 h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em meio BHI estéril, de modo a se obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

A suspensão obtida foi diluída 100 vezes, em solução salina 0,85% estéril, resultando em uma cultura com aproximadamente 10^6 UFC/mL. Aos poços da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo BHI, 20 µL das substâncias em diferentes concentrações e 80 µL da suspensão microbiana. As microplacas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitora de Elisa Bio-Tek a 620nm.

Aos poços-controle de inibição do crescimento microbiano foram adicionados meio de cultura, agente antimicrobiano e inóculo do microrganismo. A não-inibição do crescimento microbiano foi avaliada adicionado aos poços meio de cultura, Tween 80 a 1% e inóculo do microrganismo.

A CIM foi considerada a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento da cepa testada, constatado pela ausência de turvação visível do crescimento microbiano. As placas de cultura também foram submetidas à leitura de absorbância a 620 nm para confirmação dos valores de CIM e para excluir a possível interferência da turvação determinada pela presença da substância.

4.7.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM, que não

apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar *Plate-Count*. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37°C e após 24h, foi realizada a contagem das colônias crescidas na superfície do ágar (Baron & Finegold, 1994; Romeiro, 2001).

A determinação da população microbiana presente no inóculo inicial foi realizada por contagem de colônias em Ágar *Plate-Count* (Romeiro, 2001) e a concentração de substância capaz de determinar uma redução no crescimento microbiano > 99,9% foi considerada a CBM.

4.8 Avaliação da atividade antioxidante/sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das NCLS e OELS

A avaliação da capacidade em sequestrar o radical livre DPPH foi realizada por espectrofotometria de acordo com metodologia descrita por Saint-Cricq Gaulejac et al. (1999). Foram utilizadas placas de 96 poços, as quais foram adicionadas 8 µL de amostra e 292 µL de solução de DPPH (0,3 mM em solvente metanol/etanol 1:1). As amostras de NCLS e OELS foram preparadas em concentrações crescentes de 40, 60 e 80 µg/mL, relativas ao OELS. As NCB (nanocápsulas sem OELS) foram utilizadas como controle negativo e a vitamina E (á-tocoferol, 50 µL/mL, droga padrão), como controle positivo da atividade antioxidante. Após o preparo as soluções foram mantidas a temperatura ambiente (25 ± 2°C) e ao abrigo da luz por 30 min. Decorrido o tempo de reação a placa foi analisada em leitora de Elisa a 517nm.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \left[\left(\frac{A_0 - A_c}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde:

A₀= absorbância do controle

A_c= absorbância da solução na presença da droga teste

4.9 Ensaios em cultura de células

4.9.1 *Material biológico*

No presente estudo, como fonte de leucócitos polimorfonucleares, foi utilizado sangue humano de doadores saudáveis cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

4.9.2 *Isolamento de polimorfonucleares (PMNs)*

Para a realização dos ensaios com células, leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90%), foram isolados de sangue humano conforme metodologia descrita por Henson (1971) e modificada por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, lavado diversas vezes com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formação de um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, corante que se incorpora às células não viáveis devido a ocorrência de lesões na membrana plasmática. Para a execução dos testes, foram utilizados polimorfonucleares que apresentavam viabilidade celular média em torno de 95%.

4.9.3 *Avaliação da citotoxicidade através do efeito do OELS, timol e NCLS em neutrófilos humano mensurado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT*

4.9.3.1 *Teste do MTT.*

A avaliação da taxa de sobrevivência das células foi estimada pela medida da conversão do sal tetrazolium (MTT: 4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5-brometo de difeniltetrazólio) no produto formazan, o qual é colorido. Esta reação é dependente de mitocôndria para se realizar, o que indicará a viabilidade celular.

Suspensão de neutrófilos humanos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de timol (TIM) (5, 10, 25, 50 e 100

$\mu\text{g/mL}$), OELS (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), NCLS (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), formulação NB ou DMSO – 1% (controle do veículo), meio RPMI 1640 (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em placa de 96 poços e atmosfera de CO_2 . Decorrido esse período, a placa foi centrifugada 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 10 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. Em seguida as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 550 nm. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual, sendo que a diminuição da absorbância indica diminuição da viabilidade celular.

4.9.3.2 Determinação da Lactato Desidrogenase (LDH)

Neutrófilos humanos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15, 30 ou 60 minutos a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C na presença de timol (TIM) (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), OELS (5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$); NCLS (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$); formulação NB ou DMSO – 1% (controle do veículo), meio RPMI 1640 (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico). A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a 755 x g, por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, cuja localização está no citoplasma da célula e é liberada quando estas são lesadas ou necrosadas (Bergmeyer & Bernt, 1963). Esta enzima é responsável pela conversão de piruvato a lactato na presença de NADH. O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorvância em 340 nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 μL de substrato foram pré-incubados por 3 minutos a 37°C . Foi realizada a leitura da absorvância em 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos a 37°C em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A_1 - A_2) / 2] \times 1746,03$$

Onde:

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A₁= absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A₂= absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03= fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

As toxicidades de TIM, OELS e NCLS foram avaliadas em três experimentos independentes, com medidas em triplicata. A atividade da enzima liberada foi expressa em percentual.

4.9.4 Avaliação do potencial anti-inflamatório tópico das NCLS em camundongos

A avaliação do potencial anti-inflamatório tópico das NCLS foi realizada através de metodologia baseada na indução de dermatite de contato irritativa por TPA, de acordo com o método descrito por Recio et al. (2000).

O estímulo consistiu na aplicação tópica de 10 µL de uma solução de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) em acetona (2,5 µL/orelha) na orelha esquerda de camundongos, fêmeas, pesando entre 25-30 g e divididos em grupos de 6 animais.

As amostras foram aplicadas topicamente nas doses de 0,04; 0,08 e 0,327 mg/orelha (NCLS, OELS, NCB), de 0,03, 0,1, 0,3 e 0,6 mg/orelha (timol) e 0,017, 0,05 e 0,287 mg/orelha (NELS) num volume de 20 µL/orelha, 10 minutos após a aplicação do TPA. O controle positivo consistiu em indometacina administrada na dose de 0,08 mg/orelha. Animais tratados com o veículo (acetona), 20 µL/orelha por via tópica foram incluídos no estudo. A espessura da orelha, que quantifica o edema, foi registrada antes dos tratamentos e quatro horas após a administração do TPA fazendo uso de um paquímetro digital (100.174B/ Digimess®). Após o registro do edema, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos das orelhas (5 mm) coletados para a determinação da mieloperoxidase.

Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO): As orelhas de cada grupo avaliado foram trituradas em ultra turrax, para obtenção do homogenato. Este foi centrifugado, sendo coletados 50 µL do sobrenadante ao qual foi adicionado PBS (100 µL) e tampão fosfato (50 µL) e H₂O₂ (0,012%). Após 5 minutos a 37°C foi acrescido 20 µL de 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorbância foi determinada em 620 nm. A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL) permitiu relacionar a absorbância com as unidades enzimáticas/mL. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da liberação de mieloperoxidase (De Young et al., 1989).

4.9.5 Avaliação dos efeitos do OELS e do timol, sobre o metabolismo oxidativo induzido por PMA em neutrófilos, empregando a técnica de Quimioluminescência

A quimioluminescência (QL) é amplamente utilizada como um método para quantificar a capacidade dos neutrófilos de produzir EROs (Kudoh et al., 1999). Com o auxílio de marcadores luminescentes (sondas) é possível quantificá-las e diferenciá-las. As sondas são utilizadas para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de EROs. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, que geram intermediários eletronicamente excitados que, retornando a um estágio basal emitem fótons, os quais podem ser quantificados como quimioluminescência. As sondas utilizadas foram: a lucigenina (QLuc), que detecta principalmente o radical ânion superóxido (O₂⁻), liberado no meio extracelular, e o luminol (QLlum) que detecta a somatória de diversos metabólitos intracelulares produzidos pela ação da MPO.

Suspensão de neutrófilos humanos (2,5 x 10⁶ células/mL) foram pré-incubados a 37°C por 30 minutos na presença de TIM (1, 10, 50 e 100 µg/mL), OELS (2, 5, 10 e 20 µg/mL) ou NCLS (10, 50 e 100 µg/mL) e das sondas quimioluminescentes luminol (280 µM) ou lucigenina (150 µM) em placa de 24 poços. Em seguida, as placas foram transportadas para o luminômetro e a elas foi adicionado o estímulo (PMA 10⁻⁷ M) e, imediatamente, acompanhou-se a produção de QL, em cpm (contagem de fótons por minuto), durante 20 minutos a 37°C. Em

todos os ensaios realizados foi mensurada a produção espontânea de QLlum e QLLuc das células na ausência de estímulo. Os resultados foram expressos através da emissão de quimioluminescência.

4.10 Análise Estatística

Os resultados da validação do método analítico foram processados utilizando o programa Microsoft Excel[®] (2010), onde foi adotado teste da análise de variância (ANOVA) de duas vias com repetições, adotando as diretrizes estabelecidas na RE 899/2003 para avaliação estatística dos dados.

A análise estatística dos resultados de desenvolvimento de formulação e ensaios físico-químicos, químicos e biológicos foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP), ou desvio padrão relativo (DPR), e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, para ensaios com múltiplas variáveis, ou *teste t* para ensaios com duas variáveis. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

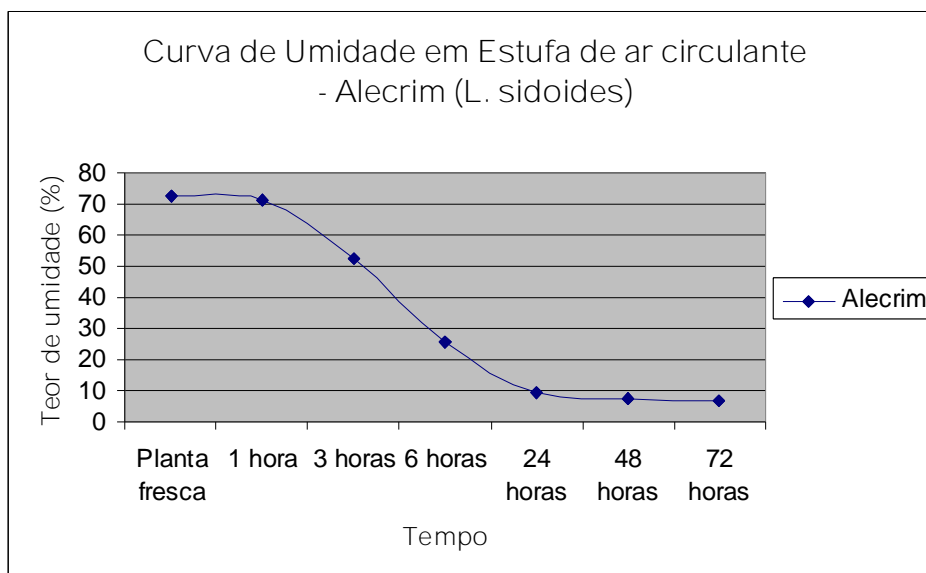
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação e caracterização farmacognóstica da droga vegetal *L. sidoides*

Inicialmente foi mensurado o tempo de secagem (1-72h) das folhas de *L. sidoides*, monitorado pelo teor de umidade determinado por balança de infravermelho. A seguir o material foi submetido à caracterização farmacognóstica com determinação de vários parâmetros: granulometria, teor de umidade, teor de cinzas totais, teor de cinzas insolúveis em ácido, teor de óleo essencial, teor de extrativos em etanol, além da prospecção fitoquímica da droga vegetal.

As folhas de *L. sidoides*, atingiram valor de umidade adequado ($7,9 \pm 1,3\%$) após 24 horas a 40°C em estufa com circulação de ar, conforme pode ser observado na figura 10. Os resultados indicam que a droga vegetal após 24 horas de secagem estabiliza a perda de umidade, portanto estas foram as condições adotadas para secagem do material vegetal para as análises subsequentes.

Figura 10- Determinação de umidade (balança I.V) da droga vegetal *L. sidoides* em função do tempo de secagem (estufa de ar circulante 40°C)



A presença de quantidade excessiva de umidade em drogas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias (Farias, 2003). Os métodos analíticos oficiais para determinação de água

em matérias-primas vegetais, incluem: método gravimétrico (dessecação), método azeotrópico (destilação com tolueno) e método volumétrico (Karl Fischer). O primeiro, tecnicamente mais simples e rápido, não é aplicável quando a droga contém substâncias voláteis (Brasil, 2010). Isto porque o aquecimento do material vegetal na estufa conforme preconizado no método de perda por dessecação, leva a evaporação tanto de água quanto de compostos voláteis, e desta forma gera um erro no resultado, que não pode ser mensurado por este método. Desta forma a droga vegetal *L. sidoides* foi analisada pelo método de Karl Fischer, e para fins de comparação, a umidade foi também mensurada através de balança de infra-vermelho (IV).

Como pode ser observado na tabela 5, não houve diferença significativa (teste *t*: $P=0.3835$), entre os valores obtidos com os diferentes métodos (Karl Fischer: $7,94 \pm 1,3$; Balança de IV: $7,20 \pm 0,12$). Fatores como o tempo de permanência da amostra na balança de IV, bem como características intrínsecas a droga vegetal, como teor e propriedades dos constituintes, podem ter contribuído, para estes resultados. Assim a balança de IV pode ser usada como método alternativo para determinar o teor de água na droga vegetal *L. sidoides*.

Tabela 5 - Teor de umidade nas folhas pulverizadas de *L. sidoides* conforme metodologia empregada.

Planta	Método	
	Gravimétrico	Volumétrico
<i>L. sidoides</i>	$7,94 \pm 1,3$	$7,20 \pm 0,12$

Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três réplicas

A análise granulométrica revelou que 93% do pó das folhas de *L. sidoides* apresentou granulometria entre 0,25 mm e 2 mm, com tamanho médio entre 0,35 e 0,71 mm. De acordo com os parâmetros da Farmacopeia Brasileira 5ªed, os valores de granulometria apresentados neste estudo se enquadram na categoria de pó grosso (Brasil, 2010). Segundo Michelin et al. (2010), a avaliação granulométrica é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido, pois exerce influência direta sobre a eficiência do processo extrativo.

Prosseguindo na determinação dos parâmetros de pureza da droga vegetal de *L. sidoides*, foi observado que o teor médio de cinzas totais e insolúveis em ácido nas folhas foi de $10,3 \pm 0,05\%$, e $0,52 \pm 0,07\%$ respectivamente (tabela 6). As cinzas totais incluem as fisiológicas, as quais são derivadas do tecido vegetal, e as não-fisiológicas, oriundas de materiais estranhos, principalmente areia e terra (Brasil, 2010), sendo a determinação do seu teor um importante parâmetro para o controle de qualidade de drogas vegetais (Michelin et al., 2011). A avaliação do teor de cinzas insolúveis em ácido permite verificar a presença de matéria inorgânica contaminante na droga vegetal, como terra e areia principalmente (Francisconi, 2015).

Tabela 6 - Teor de cinzas, extrativos em etanol e óleo essencial nas folhas de *L. sidoides*

	Cinzas totais	Cinzas insolúveis em ácido	Teor de extrativos em etanol (%)	Teor de óleo essencial
<i>L. sidoides</i>	$10,3 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,07$	$22,01 \pm 1,9\%$	$4,63 \pm 0,39$

Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três réplicas

O teor de óleo essencial obtido para as folhas de *L. sidoides* foi de $4,63 \pm 0,39\%$ (tabela 6). Alves et al. (2007), utilizando também a técnica de extração por hidrodestilação de folhas de *L. sidoides*, obteve rendimento em óleo essencial variando de 4,86 a 8,90%, conforme a origem do material vegetal analisado. Já Mello et al. (2011), encontrou uma variação de 3,08 a 5,64% de rendimento em óleo essencial obtido por hidrodestilação de folhas de *L. sidoides* coletadas em diferentes horários do dia. Neste mesmo trabalho o maior rendimento em óleo essencial foi encontrado em plantas coletadas às 9:00 da manhã, mesmo horário em que foram coletadas as amostras para realização da presente pesquisa. Nunes et al. (2005) obteve 5,3% de rendimento em óleo essencial de folhas de *L. sidoides* através de hidrodestilação. Assim diante do exposto verifica-se que o rendimento em óleo essencial obtido na presente pesquisa condiz com os resultados descritos na literatura.

Em relação ao teor de extrativos em etanol, os resultados mostraram que para as folhas de *L. sidoides* o teor de substâncias extraíveis por etanol foi 220 ± 19

mg/g (tabela 6). A determinação do teor de extrativos é um importante parâmetro de caracterização da droga vegetal, e representa uma ferramenta útil para o controle de qualidade de insumos vegetais.

O perfil fitoquímico de uma espécie constitui uma ferramenta muito útil, por exemplo na análise da autenticidade de uma espécie. Dessa forma na pesquisa fitoquímica, foram investigados a presença de saponinas, taninos, alcalóides, heterosídeos flavônicos, heterosídeos antraquinônicos, e heterosídeos antociânicos. As folhas de *L. sidoides* demonstraram reação positiva para heterosídeos flavônicos, taninos, heterosídeos antociânicos e heterosídeos antraquinônicos (tabela 7). Estudos anteriores realizados com extrato etanólico das folhas revelaram a presença de derivados fenólicos, taninos hidrolisáveis e condensados, flavanóis, xantonas, chalconas e auronas, flavanonóis, flavanonas, quinonas, esteroides e ácidos orgânicos não voláteis (Farias et al., 2012), além de sais de amônio quaternário e alcaloides fracamente básicos, flavonoides, óleo essencial, saponinas (Sivira et al., 2011), catequinas, esteroides, fenóis simples (Pinho et al., 2012), triterpenos (Fabri et al, 2011) naftoquinoides, lignanas (Costa et al, 2002), e antraquinonas (Nascimento et al. 2000).

Tabela 7 - Resultados da prospecção fitoquímica de folhas de alecrim-pimenta (*L. sidoides*)

GRUPO	REACAO POSITIVA	RESULTADO
Heterosídeos antociânicos	Mudança de coloração	Positivo
Saponinas	Espuma persistente	Negativo
Taninos reação com:	1- ppt	1- negativo
1- cloreto férrico	2- ppt	2- ppt
2- acetato de chumbo	3- ppt (tanatos insolúveis)	3- ppt
3- solução alcaloidica	4- ppt	4- ppt
4- dicromato de potássio	5- ppt	5- negativo
5- acetato de cobre	6-	6-
Heterosídeos flavônicos	Coloração vermelha	Positivo
Heterosídeos antraquinônicos	Coloração rósea	Positivo
Alcalóides reação com:	1- ppt	Negativo para todos
1- reagente de Mayer	2- ppt	
2- Bertrand	3- ppt	
3- Dragendorff	4- ppt	
4- Bouchardat	5- ppt	
5- Hager		

Na tabela 8 estão descritos os constituintes químicos identificados por CG-EM no óleo essencial extraído das folhas de *L. sidoides*

Óleos essenciais são misturas complexas voláteis, de origem natural, produzidas pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas, e que apresentam um odor característico (Bakkali et al., 2008). Na presente pesquisa, o óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) apresentou como compostos majoritários timol (65%), o-cimeno (17%) e e-cariofileno (4%). Estes resultados condizem com muitos estudos realizados com esta espécie, quando cultivada no nordeste do Brasil.

Amostras de *L. sidoides* cultivadas em Sergipe apresentaram como componentes majoritários timol (83%) e p-cimeno (6%) (Jesus et al., 2006); em outro estudo realizado também com plantas cultivadas no estado do Sergipe o teor de timol variou de 46 a 68% e p-cimeno de 10 a 15% (Alves et al., 2003). Fontenelle et al. (2007) analisando o OELS coletada no município de Horizonte/Ce, encontraram o timol (59,65%) e o e-cariofileno (10,60%) como constituintes majoritários. Enquanto Botelho et al. (2007a), analisando o OELS de plantas coletadas na região Nordeste encontrou como compostos majoritários timol (56,7%) e carvacrol (16,7%), seguidos pelo p-cimeno (7,13%).

Outro dado importante a ser destacado é a baixa concentração de carvacrol (0,44%) (tabela 8), encontrada no óleo essencial em estudo, visto que este componente em alguns trabalhos é referenciado como composto majoritário. Cavalcanti et al. (2010), estudando o óleo essencial de quatro acessos de *L. sidoides*, coletados em regiões distintas do nordeste brasileiro, encontraram o carvacrol (46,09%) seguido pelo α -terpineno (15,49%) e pelo p-cimeno (15,06%) como constituintes majoritários. Guimarães et al, 2014 verificou um teor de carvacrol de 26,44% e de 1,8- cineol de 22,63% no óleo extraído de *L. sidoides* coletadas em Itumirim-MG. Lima et al. (2011) encontraram o carvacrol (31,68%), p-cimeno (19,58%), 1,8-cineol (9,26%) e o α -terpineno (9,21%) como constituintes majoritários em espécies coletadas em Lavras-MG. As diferenças encontradas no teor e composição dos óleos essenciais podem ser decorrentes de fatores genéticos, edafoclimáticos e também influenciadas pelo ciclo vegetativo (Guimarães et al, 2014). Nesse contexto percebe-se que o OELS cultivada no Nordeste, em geral possui como constituinte majoritário o timol (Jesus et al., 2006; Alves et al.,

2003; Fontenele et al, 2007; Botelho et. Al., 2007), corroborando estudo anterior (Matos, 2002), os demais terpenos majoritários incluem p-cimeno, carvacrol e e-cariofileno (Jesus et al., 2006; Alves et al., 2003; Fontenele et al, 2007; Botelho et. al., 2007).

Em virtude da grande variação em termos qualitativos e quantitativos dos constituintes do OELS conforme a origem, a caracterização e padronização deste derivado podem ser consideradas etapas fundamentais para a pesquisa visando o desenvolvimento de preparações farmacêuticas.

Tabela 8 - Constituintes químicos presentes no óleo essencial de *L. sidoides* determinados por CG-EM

Pico	TR (min)	Composto	Área (%)
1	3,100	Propanoato de etila	0,43
2	3,135	Acetato de <i>n</i> -propila	1,52
3	3,990	Tolueno	0,66
4	4,099	Acetato de isobutila	0,74
5	8,375	alfa-pineno	0,54
6	10,356	Mirceno	3,07
7	11,600	<i>o</i> -Cimeno	17,35
8	11,729	Limoneno	0,63
9	11,823	1,8-Cineol	0,52
10	14,362	Linalool	0,26
11	17,314	4-Terpeneol	1,58
12	19,409	Timol metil éter	1,50
13	21,694	Timol	65,33
14	21,899	Carvacrol	0,44
15	25,2979	<i>E</i> -Cariofileno	4,04
16	31,230	Óxido de cariofileno	1,40
Total			100

5.2 Validação de metodologia analítica para doseamento de timol em óleo essencial de *L. sidoides* e em nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides* por CLAE-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método analítico, que nos últimos anos domina as técnicas analíticas para quantificação de medicamentos, alimentos, ensaios biológicos, entre outros. Atualmente os compêndios oficiais como as Farmacopeias Americana e Brasileira priorizam a análise de produtos farmacêuticos por CLAE, devido à especificidade e seletividade relacionadas à utilização desta técnica (Oliveira, 2009).

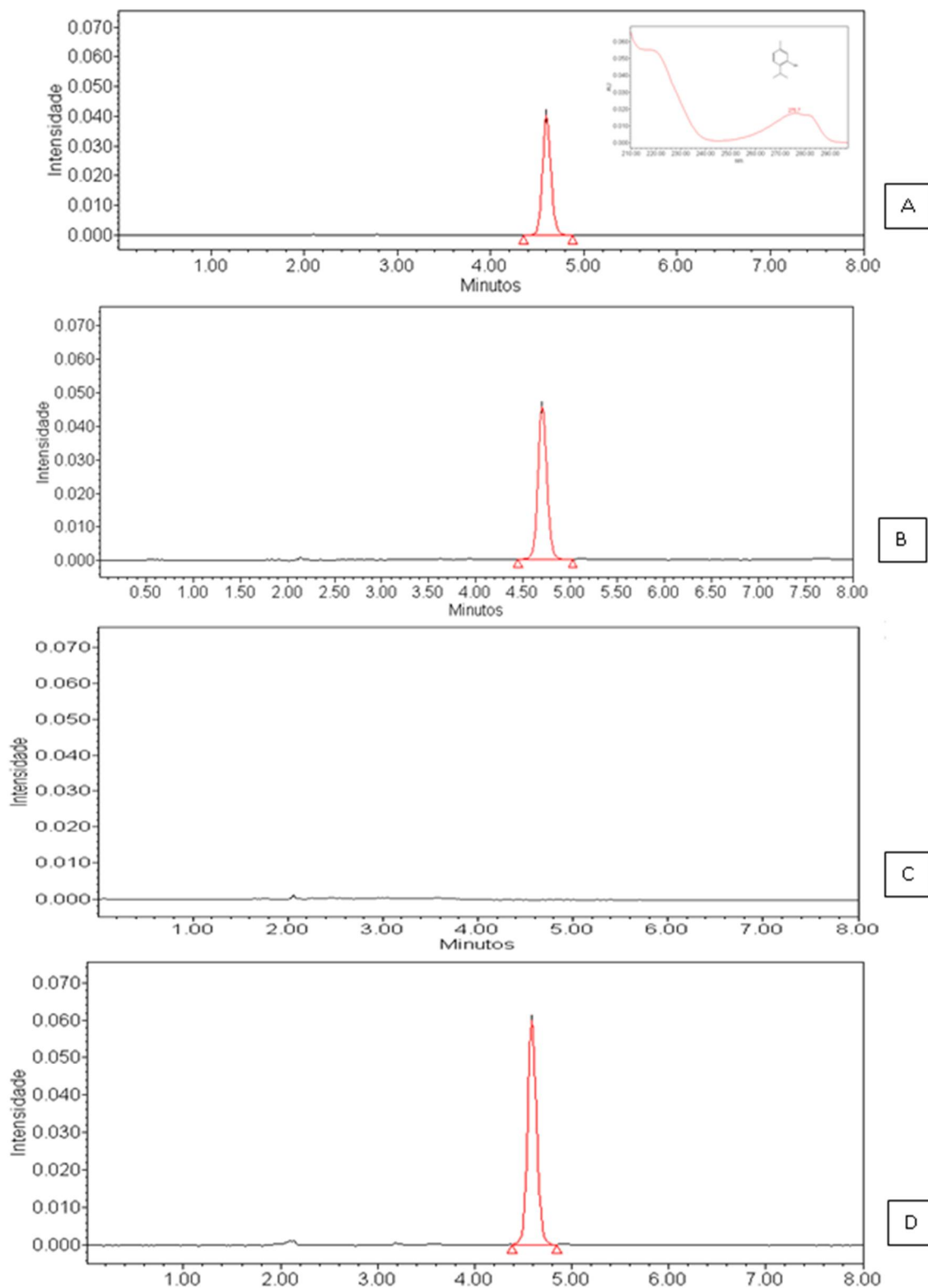
Considerando que o OELS foi empregado como matéria prima ativa na formulação das nanocápsulas, foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD a ser empregado no controle de qualidade desse produto.

5.2.1 Seletividade

A seletividade, ou especificidade é considerada a primeira etapa de validação de métodos analíticos, pois é através deste estudo que pode-se inferir se os componentes da matriz ou excipientes não interferem na quantificação do fármaco (Eloy et al, 2012).

O ensaio referente à especificidade da metodologia demonstrou que o método foi capaz de identificar o componente timol no tempo de retenção 4,65 minutos tanto no OELS quanto nas nanocápsulas de *L. sidoides* (NCLS) (figura 11 A, B e D). A análise cromatográfica das nanocápsulas branco (NCB), ou seja, nanocápsulas sem o ativo, demonstrou que os excipientes que compõem a matriz não interferem na análise de timol por esta metodologia visto que não houve aparecimento de outros picos no cromatograma (figura 11 C). Desta forma podemos inferir que o método proposto é específico para quantificação de timol em NCLS.

Figura 11 - Cromatogramas por CLAE-DAD a 276 nm referentes a (A) timol, (B) óleo essencial de *L. sidoides*, (C) NCB -nanocápsulas sem ativo, (D) NCLS.

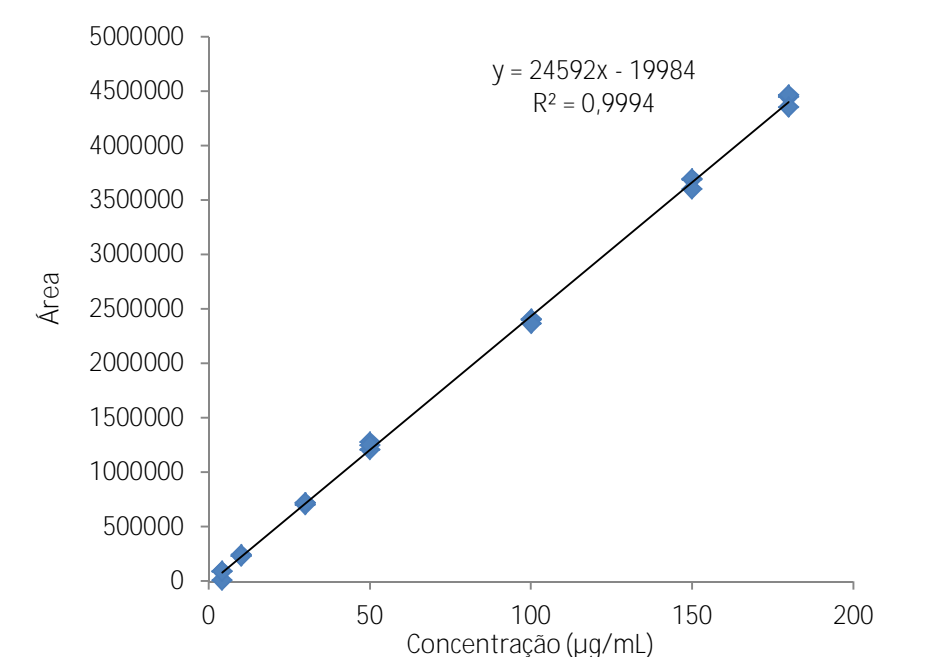


5.2.2 Linearidade e intervalo

A análise do parâmetro linearidade fornece informações sobre a capacidade do método em fornecer resultados proporcionais à concentração do analito presente na amostra (Rosa et al. 2012).

A linearidade foi estudada através da análise de variância calculando-se a regressão linear pelo método dos quadrados mínimos, utilizando-se uma curva composta por 5 concentrações (3 réplicas /cada), do OELS e das NCLS dentro do intervalo de concentrações estabelecido para o padrão timol (4-180 µg/mL). A curva analítica construída com sete concentrações do padrão timol (3 réplicas) apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9994, a equação da reta obtida foi do tipo $y = a.x + b$, onde y representa a área do pico que é uma função linear da concentração da substância "x". Na figura 12 podem ser observadas graficamente a curva analítica do padrão timol e a equação da reta correspondente $y = 24592x - 19984$.

Figura 12 - Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE-DAD, referente a sete concentrações de timol (4-180 µg/mL) avaliadas no estudo da linearidade do método para quantificação de timol em OELS e NCLS.

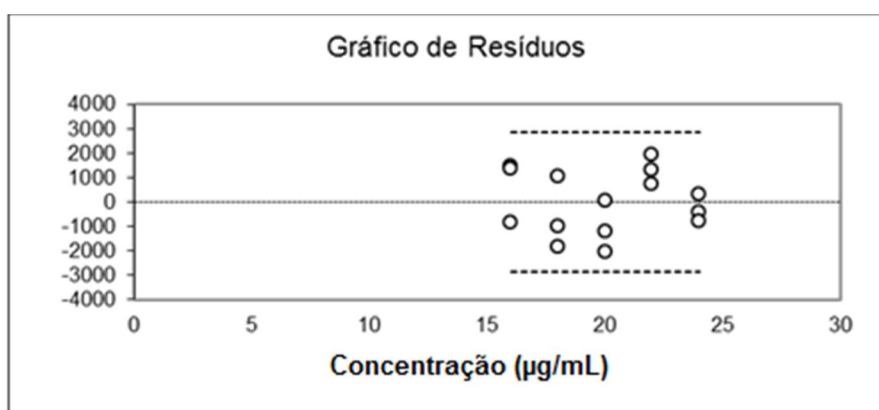


As curvas das cinco concentrações de OELS e de NCLS avaliadas apresentaram coeficiente de correlação (r) 0,9991 e 0,9979 respectivamente.

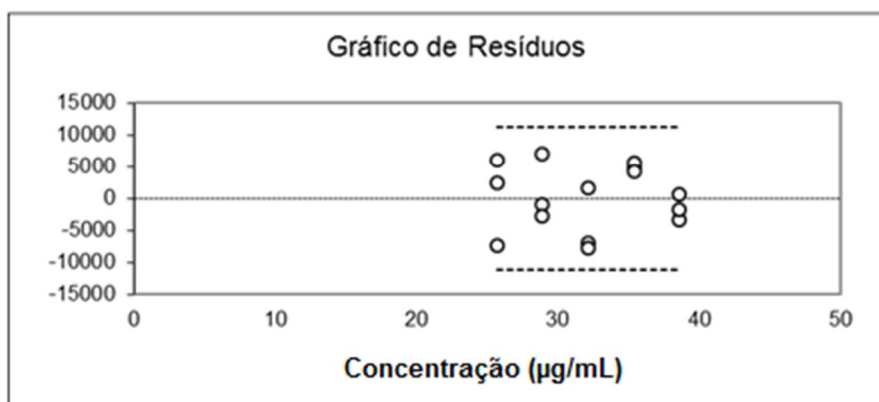
Além do coeficiente de correlação da reta (r) outro parâmetro importante na avaliação da linearidade do método é a análise do gráfico de resíduos. Através desta análise é possível detectar problemas no ajuste da curva tais como: desvios de linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedasticidade, e dependência entre os erros. Portanto uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedasticidade), bem como ausência de amostras atípicas (Ribeiro et al., 2008).

Como pode ser observado na figura 13 os resíduos referentes às curvas analíticas obtidas com o OELS e com as NCLS, apresentam-se normalmente e independentemente distribuídos ao redor do zero, demonstrando ausência de autocorrelação entre os mesmos.

Figura 13 - Resíduos referente a curva de linearidade de cinco concentrações de OELS (A) e de NCLS (B)



A



B

Segundo Ribeiro et al. (2008) os resíduos representam a parcela da variabilidade dos dados que não foi explicada pelo ajuste, e são interpretados como uma estimativa do erro do modelo. Desta forma, na representação gráfica os resíduos devem ser normalmente e independentemente distribuídos ao redor do zero, e deve apresentar média zero e variância constante. No presente estudo os resíduos tanto do padrão timol quanto do OELS e NCLS obedeceram a este critério.

A análise de variância (ANOVA) realizada para a curva de calibração do timol ($P = 0,57$) assim como para o OELS ($P = 0,39$) e NCLS ($P = 0,20$) demonstraram que o presente método não possui desvios de linearidade significativos. Os dados referentes ao tratamento estatístico dos dados de linearidade do método estão demonstrados no anexo 1. Desta forma podemos inferir que o método desenvolvido possui resposta linear do detector para o timol dentro da faixa de 4 – 180 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.3 Limites de detecção e quantificação

A análise estatística dos dados referentes à linearidade do método permitiu o cálculo do limite de detecção (LD), e do limite de quantificação (LQ), através do intervalo de confiança da curva analítica. O limite de detecção para doseamento de timol foi de 0,4 $\mu\text{g/mL}$, e o limite de quantificação 1,02 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.4 Precisão

Para que o método analítico garanta uma análise fidedigna do fármaco a ser quantificado, o mesmo deve ser preciso, ou seja, apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração, e ao mesmo tempo, exato, o que significa que deve haver concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (Eloy et al, 2012).

O ensaio de precisão avaliou a concordância dos resultados nos níveis de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída). O OELS e as NCLS apresentaram valores de DPR de 1,05, e 2,22, respectivamente para a repetibilidade a 100% da concentração teórica do teste (tabelas 9 e 10). Na avaliação da precisão intermediária, os valores de DPR para o

OELS variaram de 0,62 a 3,06, e para as NCLS de 0,34 a 3,71 (tabelas 11 e 12). O teste F (ANOVA) aplicado para avaliar a igualdade entre as variâncias no ensaio de precisão intermediária, demonstrou que não houve diferenças significativas entre as análises realizadas por diferentes analistas ou em dias diferentes ($p > 0,05$), conforme pode ser verificado nas tabelas 13 e 14, tanto para o OELS quanto para as NCLS. Portanto pelos resultados obtidos podemos inferir que o método ora avaliado é preciso.

Tabela 9 - Avaliação da Precisão intra-corrida (repetibilidade) do método para dosagem de timol em OELS por CLAE-DAD.

Concentração	Dia 1 Teor %	Média	DPR
100%	101,1	100,5	1,05
	99,7		
	101,6		
	101,1		
	98,8		
	100,8		

Resultados expressos em teor nominal de timol no OELS, referente a média \pm desvio padrão relativo (DPR) de três replicas, onde 100% de teor equivale a 640 mg de timol em cada 1 mL de OELS.

Tabela 10 - Avaliação da Precisão intra-corrida (repetibilidade) do método para dosagem de timol em NCLS por CLAE-DAD.

Concentração	Dia 1 Teor %	Média	DPR
100%	99,4	99,5	2,22
	95,6		
	99,4		
	102,4		
	100,5		
	99,6		

Resultados expressos em teor nominal de timol nas NCLS, referente a média \pm desvio padrão de três replicas, onde 100% de teor equivale em média a 3,2 mg de timol em cada 1 mL de NCLS.

Tabela 11 - Avaliação da Precisão inter-corrida (precisão intermediária) do método para dosagem de timol em OELS por CLAE-DAD.

Dia	Analista	Concentrações timol/OELS					
		80 %		100 %		120 %	
		Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR
1	I	100,4	0,62	99,8	3,06	100,6	1,27
	II	98,4	0,34	99,7	1,80	100,8	1,98
2	I	100,9	1,06	100,0	0,34	99,4	1,34

Resultados expressos em teor nominal de timol no OELS, referente a média \pm desvio padrão de três replicas, onde 100% de teor equivale a 640 mg de timol em cada 1 mL de OELS.

Tabela 12 - Avaliação da Precisão inter-corrida (precisão intermediária) do método para dosagem de timol em NCLS por CLAE-DAD

Dia	Analista	Concentrações timol/NCLS					
		80 %		100 %		120 %	
		Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR
1	I	103,4	2,18	98,9	1,34	99,4	0,34
	II	102,8	1,68	95,5	3,71	102,4	1,42
2	I	103,2	1,62	99,5	2,10	101,9	2,27

Resultados expressos em teor nominal de timol nas NCLS, referente a média \pm desvio padrão de três replicas, onde 100% de teor equivale em média a 3,2 mg de timol em cada 1 mL de NCLS.

Tabela 13 - Avaliação estatística dos resultados referentes ao ensaio de precisão intermediária para o OELS

Condição experimental	Concentrações timol/OELS						F_{crit}
	80 %		100 %		120 %		
	F	P	F	P	F	P	
Dia 1 analista I <i>versus</i> dia 1 analista II	9,512	0,09	0,00	0,96	0,02	0,88	18,513
Dia 1 analista I <i>versus</i> dia 2 analista I	0,108	0,77	0,07	0,80	0,97	0,42	

Tabela 14 - Avaliação estatística dos resultados referentes ao ensaio de precisão intermediária para NCLS

Condição experimental	Concentrações timol/NCLS						F_{crit}
	80 %		100 %		120 %		
	F	P	F	P	F	P	
Dia 1 analista I <i>versus</i> dia 1 analista II	1,31	0,37	0,72	0,48	4,25	0,17	18,51
Dia 1 analista I <i>versus</i> dia 2 analista I	0,66	0,49	6,36	0,12	1,36	0,36	

5.2.5 Exatidão/ Recuperação

O ensaio de exatidão visa comprovar a eficácia do método na quantificação de determinado analito na amostra (Rosa *et al* 2012). Segundo Brito (2003) a recuperação está intimamente relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Desta forma a exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. Este erro sistemático pode ocorrer devido à baixa recuperação do analito no processo de extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (Brito *et al* 2003). Os resultados da análise de exatidão realizado em três níveis de concentração para o OELS e para as NCLS estão expressos nas tabelas 15 e 16. Como pode ser observado o método apresentou uma recuperação em torno de 97,24 %, com DPR de 1,04 para quantificação de timol em OELS, e uma recuperação de 98,2 %, com DPR de 1,98 para NCLS.

Tabela 15 - Resultados da análise de exatidão do método para doseamento de timol em OELS

Concentração	Recuperação (%)*	Media (%)	DPR
10 µg/mL	96,1 ± 0,05	97,24	1,04
50 µg/mL	97,6 ± 1,23		
100 µg/mL	98,0 ± 2,13		

* resultados da média \pm desvio padrão de 3 determinações

Tabela 16 - Resultados da análise de exatidão do método para doseamento de timol em NCLS

Concentração	Recuperação (%) [*]	Media (%)	DPR
10 µg/mL	99,9 \pm 3,81	98,2	1,98
50 µg/mL	98,6 \pm 1,60		
100 µg/mL	96,1 \pm 2,99		

*Resultados referentes a média \pm desvio padrão de 3 determinações

5.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada pela variação dos parâmetros temperatura da coluna, fluxo de fase móvel e fabricante da coluna. Como pode ser observado na tabela 17, nenhum dos parâmetros interferiu significativamente no doseamento do ativo ($P = 0,3929$). Segundo a RE 899/2003 a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança da metodologia durante o uso normal. Portanto pelos resultados apresentados podemos inferir que o método desenvolvido pode ser considerado robusto em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 17 - Influência dos parâmetros temperatura, coluna e fluxo da fase móvel na robustez do método de quantificação do ativo timol em OELS

	Condição padrão do método	Temperatura 30°C	Coluna Fenomenex	Fluxo 1,0 mL/min
Teor (%)	101,8 \pm 0,96	99,3 \pm 2,87	98,3 \pm 2,14	101,8 \pm 4,47

Resultados expressos em teor nominal de timol no OELS, referente à média \pm desvio padrão de três replicas, onde 100% de teor equivale a 640 mg de timol em cada 1 mL de OELS. Anova, seguido de teste de Tukey, diferenças significativas $p < 0,05$.

5.3 Desenvolvimento da formulação de nanocápsulas

O processo de desenvolvimento da formulação de nanocápsulas contendo OELS envolveu duas etapas:

Na primeira etapa foram preparadas 9 formulações diferentes e cada formulação preparada três vezes, sendo avaliada a influência de diferentes concentrações de fosfatidilcolina, utilizada como tensoativo da fase orgânica e de poloxamer 407, tensoativo da fase aquosa. As propriedades observadas na variação desses tensoativos foram: tamanho da nanocápsula, índice de polidispersão (PDI), e potencial zeta. O objetivo desta primeira etapa foi encontrar as proporções de tensoativos mais adequadas à formação do nanossistema contendo OELS.

Na segunda etapa as formulações que apresentaram as propriedades estudadas mais favoráveis foram selecionadas para adição do polímero de revestimento PLGA.

Os resultados referentes ao tamanho de partícula, potencial zeta e PDI das nove formulações obtidas na primeira etapa do desenvolvimento podem ser observados na tabela 18. Na figura 14 estão representadas as curvas de distribuição de tamanho das mesmas.

Tabela 18 - Caracterização quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanossistemas contendo OELS desenvolvidos na primeira etapa.

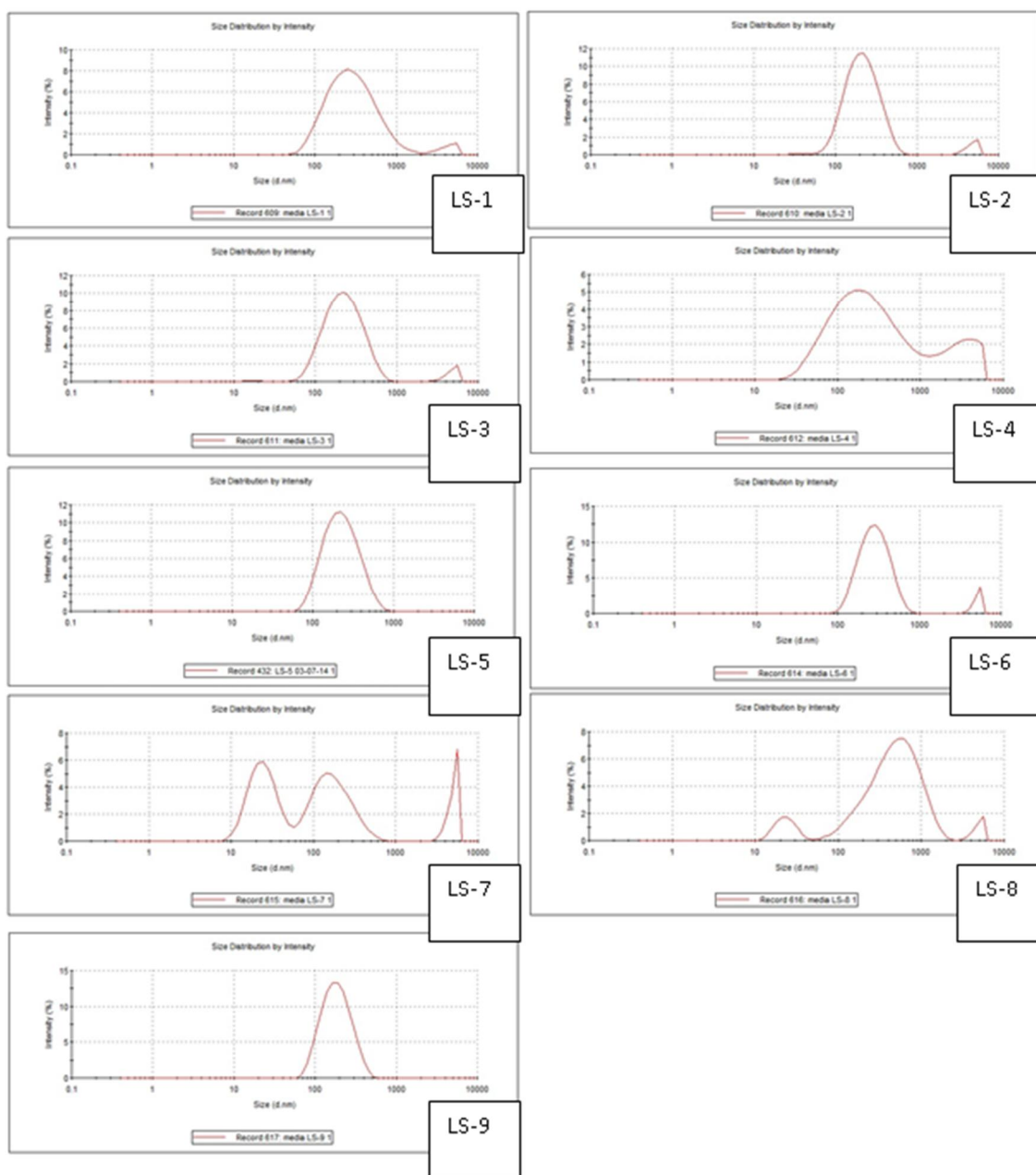
Formulações	Proporção fosfatidilcolina/ poloxamer	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta
LS-1	60/120	369,4 ± 5,9	0,39 ± 8,2	-29,6 ± 4,8
LS-2	60/180	281,5 ± 1,7	0,40 ± 16,1	-33,2 ± 3,8
LS-3	60/240	345,6 ± 3,9	0,35 ± 4,1	-35,4 ± 3,1
LS-4	90/120	202,8 ± 8,1	0,52 ± 27,9	-20,1 ± 7,5
LS-5	90/180	189,7 ± 0,9	0,20 ± 5,7	-28,0 ± 2,9
LS-6	90/240	485,4 ± 2,7	0,43 ± 5,2	-32,5 ± 1,5
LS-7	120/120	256,4 ± 11,2	0,31 ± 9,4	-22,8 ± 7,5
LS-8	120/180	291 ± 9,5	0,62 ± 27,1	-28,8 ± 3,7
LS-9	120/240	160,5 ± 0,9	0,18 ± 1,1	-23,9 ± 3,3

Resultados referentes a media ± DRP de três repetições

As 9 formulações desenvolvidas apresentaram tamanho entre 160 e 485 nm, sugerindo que, a interação entre a fase oleosa e os tensoativos escolhidos favorecem a formação de nanosistema (Bouchemal et al., 2004).

Além do diâmetro médio das partículas um parâmetro de grande relevância a ser observado no desenvolvimento de nanosistemas é o índice de polidispersão. Quanto maior o PDI de uma amostra mais heterogêneo se encontra o sistema, em relação ao tamanho das partículas dispersas (Souza et al., 2012). A variação de tamanho das partículas pode influenciar na farmacocinética da preparação, levando a uma liberação e distribuição não uniforme do ativo (Beck, Guterres, Pohlmann, 2011), podendo ainda ocasionar processos de instabilidade (Venturini et al., 2011; Rocha-Filho, 2014). Valores de PDI inferiores a 0,25 são considerados adequados (Flores et al., 2011). Como observado na tabela 18 os valores de PDI para as formulações desenvolvidas, foram entre $0,17 \pm 1,11$ a $0,62 \pm 27,06$, estes resultados demonstram a importância da etapa de desenvolvimento na obtenção de nanosistemas com características otimizadas, pois a metodologia favorece a obtenção de partículas na escala nanométrica, porém é necessário encontrar um balanço adequado entre tensoativos e fase oleosa que propicie uniformidade de tamanho (Rocha-Filho et al., 2014).

Figura 14 - Distribuição de tamanho por intensidade das formulações de nanosistemas contendo OELS obtidas na primeira etapa do desenvolvimento.



Além disso a curva de distribuição de tamanho das amostras apresentou característica unimodal (único pico) apenas para duas (LS-5 e LS-9) das nove formulações avaliadas (figura 14). A presença de mais de um pico na curva de distribuição granulométrica do sistema significa que a amostra contém populações de partículas de diferentes tamanhos (Louchard, Silva, Leal, 2014). Portanto para avaliar a homogeneidade do sistema é necessário observar tanto o valor de PDI quanto a característica da curva de distribuição granulométrica.

Pode-se observar que os menores diâmetros médios de partícula ($189,7 \pm 0,9$ nm e $160,5 \pm 0,9$ nm), assim como os menores valores médios de PDI ($0,21 \pm 5,7$ e $0,18 \pm 1,1$) foram obtidos com as proporções 90/180 e 120/240 de fosfatidilcolina/ poloxamer, correspondente às formulações LS-5 e LS-9, respectivamente. Em relação ao potencial zeta os maiores valores médios em módulo (valores absolutos) foram obtidos com as formulações LS-3 e LS-2 ($-35,4 \pm 3,1$ e $-33,2 \pm 3,8$) contendo 120/120 e 120/90 de poloxamer/ fosfatidilcolina, respectivamente.

O potencial zeta, que reflete o potencial elétrico na superfície das partículas, apresentou valores entre $-20,3 \pm 7,3$ a $-35,8 \pm 3,1$, para as formulações avaliadas. O valor do potencial zeta é influenciado pelas mudanças na interface da partícula 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 (Magenheim et al., 1991; Mosqueira et al., 2000).

Alguns trabalhos indicam que a fosfatidilcolina favorece valores de potencial zeta mais negativos (Legrand et al., 1999; Schuh, Bruxel, Teixeira, 2014, Valcourt et al., 2016), porém no presente estudo não foi observado uma relação direta em que o aumento da concentração de fosfatidilcolina proporcionasse um aumento do potencial zeta das formulações. O Poloxamer apesar de sua característica não iônica, é descrito por alguns autores como capaz de provocar alterações no potencial zeta, favorecendo uma diminuição do potencial em módulo (Besheer, et al., 2008; Beck, Guterres, Polmann, 2011). O poloxamer é um polímero tribloco do tipo ABA, onde “A” representa cadeias de óxido de polietileno (POE) hidrofílico, e “B” representa óxido de polipropileno (PPO) hidrofóbico. As cadeias PPO hidrofóbicas direcionam o polímero a se adsorver na superfície das gotículas de óleo essencial, enquanto que as cadeias de PEO hidrofílicas rodeiam as gotículas de óleo essencial proporcionando impedimento estereoquímico contra a agregação (Liu et al., 2011). A formação da gotícula da nanoemulsão envolve a deposição dos tensoativos poloxamer e fosfatidilcolina em torno da gotícula do óleo essencial para formação da interface (Tadros et al, 2004), portanto diferentes proporções de tensoativos irão influenciar nas características físico-químicas da interface, impactando diretamente no potencial zeta das formulações. Uma interface

coesa e compacta é indicativo de estabilidade para o sistema emulsionado (Anton, Benoit, Saunier, 2008).

Dentre as nove formulações avaliadas, as formulações LS-5 e a LS-9, possuem a mesma razão de tensoativo lipofílico/hidrofílico, ou seja 1:2, sendo estas as que apresentaram as melhores características de tamanho e PDI, e as únicas que apresentaram curva de distribuição unimodal. Estes resultados sugerem que a proporção 1/2 de fosfatidilcolina/poloxamer nas quantidades avaliadas (90/180 e 120/240 mg, para uma quantidade de OELS 150 mg) favorecem um melhor empacotamento em torno das gotículas de OELS tornando o sistema mais homogêneo (Rocha-filho, et al., 2014; Bouchemal et al, 2004).

A segunda etapa do desenvolvimento consistiu em adicionar diferentes concentrações do polímero lipofílico (PLGA) as formulações selecionadas na etapa anterior, que foram a LS-5 e LS-9. Desta forma foram preparadas quatro formulações, adicionando o polímero nas concentrações de 36 mg ou 72 mg para um volume final de 20 mL após concentração. Estas concentrações foram escolhidas baseadas em estudos prévios do grupo de pesquisa do CEFAC (Louchard, Silva, Leal, 2014).

A formulação LS-5 (72) foi descartada do experimento pois se mostrou instável, com precipitação do polímero logo após a evaporação do solvente. Devido ao fato do polímero PLGA ser solúvel em acetona e insolúvel na água, após a remoção da água do sistema a quantidade de polímero que não foi incorporada na estrutura das nanocápsulas pode se dispersar pela fase contínua (água) formando aglomerados insolúveis. A formulação LS-9 (36) apresentou PDI alto ($0,39 \pm 1,5$), e característica de curva bimodal. Enquanto que as formulações LS-5 (36) e LS-9 (72) conforme mostra a tabela 19 apresentaram boas características de tamanho ($185,2 \pm 3,2$, e $178,4 \pm 3,7$) e PDI ($0,211 \pm 5,20$ e $0,251 \pm 3,6$). Destas a formulação LS-5 contendo 36 mg/mL de PLGA foi a selecionada por conter menores concentrações de tensoativos e polímero, o que gera um impacto positivo no custo final do produto desenvolvido. Para fins de padronização A formulação LS-5 receberá a denominação de NCLS nos ensaios de caracterização e demais ensaios subsequentes.

Tabela 19 - Tamanho e índice de polidispersão de nanocápsulas contendo OELS produzidas na segunda etapa do desenvolvimento

Formulações Polímero (mg)	Tamanho (nm)	PDI
LS-5 (3,6)	185,2 ± 3,2	0,211 ± 5,2
LS-9 (3,6)	144,6 ± 2,6	0,388 ± 1,5
LS-9 (7,2)	178,4 ± 3,7	0,251 ± 3,6

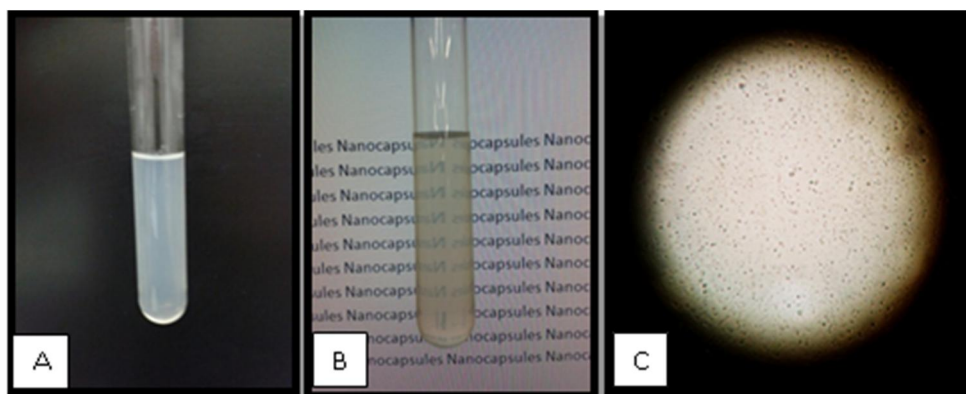
Resultados representam a média ± DPR de três réplicas

5.4 Caracterização das nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides*

A análise macroscópica da formulação de NCLS desenvolvida revelou uma solução fluida, translúcida, de aspecto leitoso, com reflexo azulado, característico de partículas em tamanho nanométrico (figura 15A e B).

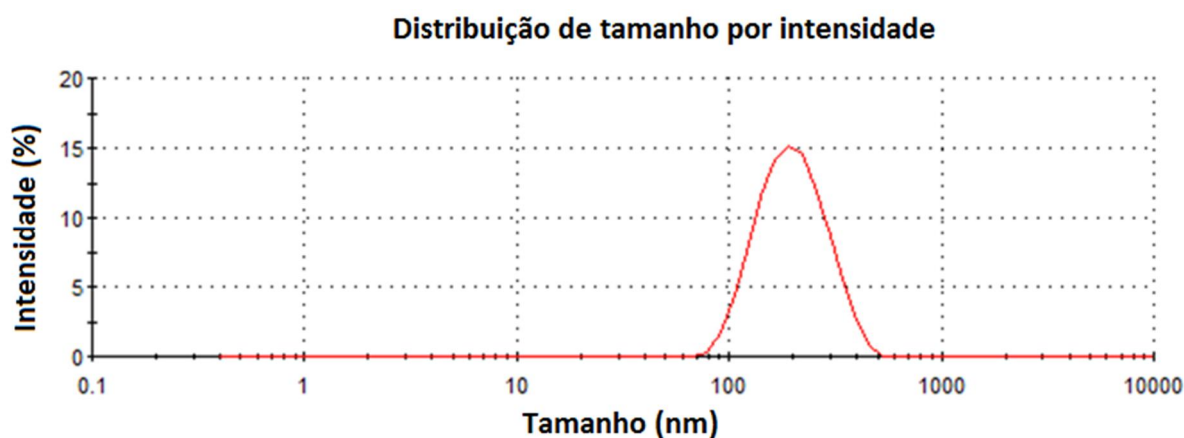
A análise microscópica em aumento de 1000 x (microscópio ótico) permitiu observar partículas esféricas de tamanho diminuto, com presença de movimento browniano (figura 15C). Segundo Tadros *et al.* (2004), o tamanho diminuto dos glóbulos nos nanosistemas causa grande redução na atuação da força da gravidade, e o movimento browniano pode ser suficiente para superá-la, o que contribui grandemente para a estabilidade apresentada nestes sistemas.

Figura 15 - Aparência macroscópica da suspensão de NCLS (A, B), e microscópica (C) por microscopia óptica – aumento de 1000 x



As NCLS obtidas neste estudo apresentaram características satisfatórias quanto ao tamanho (em torno de 185 nm), potencial zeta (-23 mV), índice de polidispersão de 0,21, e curva de distribuição de tamanho com característica unimodal (figura 16).

Figura 16 - Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente a NCLS



O tamanho, potencial zeta e PDI das NCLS determinadas no presente estudo foram similares a estudos semelhantes envolvendo a nanoencapsulação de compostos terpênicos utilizando polímeros biodegradáveis. Nanopartículas de carvacrol, com composição semelhante à deste trabalho (PLGA, Fosfatidilcolina, Poloxamer F68), apresentaram tamanho médio de 209 nm, PDI 0,26 e potencial zeta de -19 (Iannitelli et al., 2011). Nanocápsulas contendo óleo essencial de melaleuca constituídas de poli(ε-caprolactona), monooleato de sorbitano, e polissorbato 80, apresentaram tamanho de 212 nm, PDI 0,17 e potencial zeta -13,5 (Flores et al., 2011). Nanoesferas e nanocápsulas a base de poli(ε-caprolactona), Poloxamer 188

e fosfatidilcolina, contendo como ativo o 1,8-cineol (eucaliptol) apresentaram tamanho médio de partículas de 170 nm e 239 nm, PDI 0,111 e 0,145, e potencial zeta -30,5 e -33,3, respectivamente (Louchard, Silva, Leal, 2014).

5.4.1 Análise morfológica das nanocápsulas através de microscopia de força atômica (AFM)

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), varredura (MEV) e força atômica (AFM) tem sido usadas para avaliar a morfologia de nanocarreadores (Beck, Guterres, Pohlmann, 2011; Siqueira-Moura et al., 2013; Gonzaga et al., 2014). Dentre estas a AFM possui a vantagem de ser uma técnica não destrutiva e que não necessita de um processo de secagem prévio da amostra (Alencar, 2010).

A análise das NCLS por microscopia de força atômica (AFM), revelou partículas perfeitamente esféricas, com ausência de aglomerados (figura 17). Além disso foi possível visualizar a estrutura característica das nanocápsulas onde uma membrana polimérica envolve o núcleo interno contendo o ativo. Outra característica morfológica observada foi a ausência de rugosidades na superfície da esfera, permitindo inferir que o polímero se deposita uniformemente sobre a partícula.

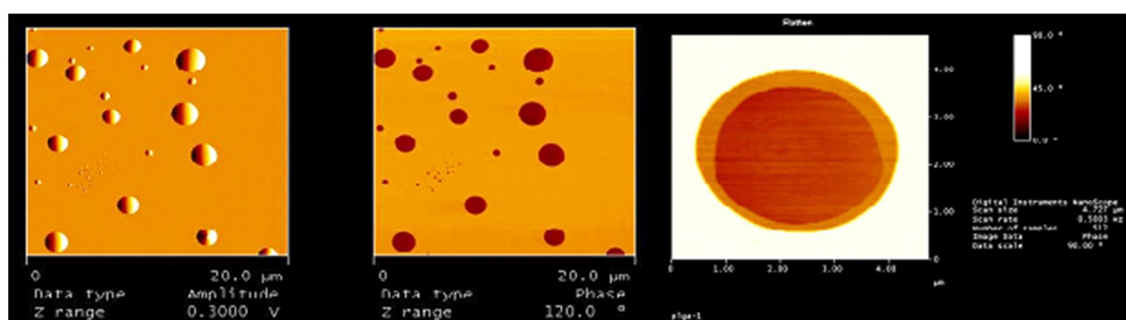
Formulações de nanosistemas semelhantes aos obtidos neste estudo, a base de OELS e polímeros de origem natural como goma de caju e quitosana (Abreu et. al., 2012), e goma de caju e alginato (Oliveira, Paula, de Paula 2014), utilizando método de preparo por spray dryer, quando analisadas por MEV apresentaram partículas de formato esférico, porém com presença de aglomerados. Ambos os autores discutem que a formação de agregados se deve a técnica de secagem (Spray dryer) e que este é um fenômeno comum em nanopartículas produzidas a partir de gomas naturais.

Por outro lado estudo, envolvendo a nano encapsulação de terpenos (anetol e carvona), que são compostos de natureza química semelhante ao OELS, utilizando o polímero PLGA, demonstraram por MEV partículas perfeitamente

esféricas e com distribuição homogênea de tamanho (Esfandyari-Manessh et al, 2013).

Desta forma o formato esférico e a ausência de aglomerados observados nas NCLS do presente estudo devem estar relacionados, pelo menos em parte, ao emprego do polímero PLGA na formulação.

Figura 17 - Imagens das NCLS, obtidos através de varredura por sonda mecânica (microscopia de força atômica)



5.4.2 Doseamento - Quantificação do marcador timol em nanocápsulas de *L. sidoides*

A quantificação do marcador timol foi realizada por CLAE-DAD, conforme método validado (item 4.2). Na tabela 20 podem ser observados os valores referentes à quantificação do marcador timol tanto no óleo essencial quanto nas três amostras de nanocápsulas avaliadas.

Os resultados demonstram que o OELS contém em média 64% de timol em sua composição. As NCLS apresentaram teor de timol de 3,1 mg/mL (CV=2,5%), e rendimento de 79,3%, em relação ao processo de preparação, o que demonstra a adequabilidade do método, na obtenção de nanocápsulas com alto teor de rendimento, mesmo se tratando de composto volátil.

Em estudo semelhante Flores et al. (2011) obteve um rendimento de 95,7% no preparo de nanocápsulas com óleo essencial de melaleuca utilizando o método de nanoprecipitação. O alto rendimento obtido por estes autores pode ser

devido ao fato de não aquecerem as fases aquosa e orgânica antes ou durante a homogeneização e utilizarem baixa temperatura para evaporação do solvente.

O processo de preparo das NCLS envolve duas etapas de aquecimento, uma antes de verter a fase orgânica sobre a fase aquosa e outra para a retirada do solvente orgânico. Como os óleos essenciais são compostos voláteis, estas etapas de aquecimento podem levar o solvente orgânico a arrastar parte do OELS durante a evaporação, o que explicaria as perdas do processo em torno de 20,7%. Este resultado foi semelhante ao obtido por Iannitelli et al. (2011), em que nanocápsulas de carvacrol produzidas pelo mesmo método, apresentaram rendimento de 80%.

Tabela 20- Quantificação de timol em óleo essencial e nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides*

	Teor de timol mg/mL de OE	% de timol/mL de OE	Teor de timol mg/mL de nanocápsulas
OE	646,3372	64,63372	-
NCLS-1	502,7072	50,27072	3,01624333
NCLS-2	510,5702	52,72369	3,16342133
NCLS-3	514,5222	50,75702	3,04542133

OE- óleo essencial de *L. sidoides*; NCLS-1- nanocápsulas de *Lippia sidoides* amostra 1; NCLS-2 - nanocápsulas de *Lippia sidoides* amostra 2; nanocápsulas de *Lippia sidoides* amostra 3.

5.4.3 Eficiência de encapsulação

O teor de incorporação de ativos em nanocápsulas tem demonstrado ser altamente dependente do grau de lipofilia do ativo, do pH da fase aquosa, e conseqüentemente da afinidade do ativo pelo óleo utilizado como núcleo. Em condições otimizadas a eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos nas nanocápsulas pode alcançar até 100% (Neckel & Lemos Senna, 2005).

A formulação de nanocápsulas desenvolvida no presente estudo possui a característica do núcleo oleoso ser constituído integralmente do ativo OELS, ou seja, nenhum outro óleo foi adicionado a formulação. Os resultados demonstraram que a eficiência de encapsulação das NCLS ficou em torno de 91,9% (DPR = 0,65%). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Esfandyari-Manesh et al. (2013)

que conseguiram uma eficiência de encapsulação dos terpenos anetol e carvona de 87% e 68% respectivamente.

Outros trabalhos envolvendo o OELS veiculado em nanocarreador obtiveram uma eficiência de encapsulação entre 40 a 70% para sistemas compostos de nanogeis de goma de caju e quitosana (Abreu et al., 2012); entre 16,0 e 77,8% para nanopartículas de goma de angico e quitosana (Paula et al., 2010); e entre 21 a 48% para sistemas compostos de goma de caju e alginato (Oliveira, Paula, de Paula, 2014). Desta forma podemos inferir que a composição das nanocápsulas desenvolvidas neste estudo promoveu uma alta eficiência de encapsulação do ativo OELS.

5.4.4 Estudo termoanalítico: Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Em DSC, as curvas de aquecimento, chamadas de curvas *Le Chatelier* acompanham a variação na temperatura de uma amostra em função do tempo, quando esta amostra é aquecida. Caso não ocorra nenhum fenômeno físico ou químico com a amostra observa-se uma reta para a variação de temperatura em relação ao tempo. Já se ocorrer um fenômeno que promova a liberação de calor, ou seja, um processo exotérmico, verifica-se um aumento na temperatura durante o processo, representada por uma inflexão no perfil temperatura – tempo, que gera um “pico” para cima. Já no processo endotérmico, com absorção de calor, observa-se a diminuição na temperatura da amostra e a inflexão na curva gera um pico para baixo (Bernal et al., 2002).

Os excipientes que compõem as nanocápsulas (poloxamer, fosfatidilcolina, PLGA), o ativo OELS, a mistura física de todos os componentes, a formulação de NCLS, e misturas na proporção 1:1 ativo/excipientes, foram submetidos ao ensaio termoanalítico de calorimetria exploratória diferencial (DSC), com o objetivo de caracterizar o sistema e avaliar possíveis interações entre os componentes da formulação.

Nas figuras 18 a 22 estão representadas as curvas termoanalíticas referentes aos componentes da formulação de NCLS, isolados ou em associação. Na tabela 21 estão descritos os eventos referentes à curva termoanalítica de cada amostra avaliada.

Figura 18 - Curva de DSC referente ao óleo essencial de *L. sidoides* (OELS)

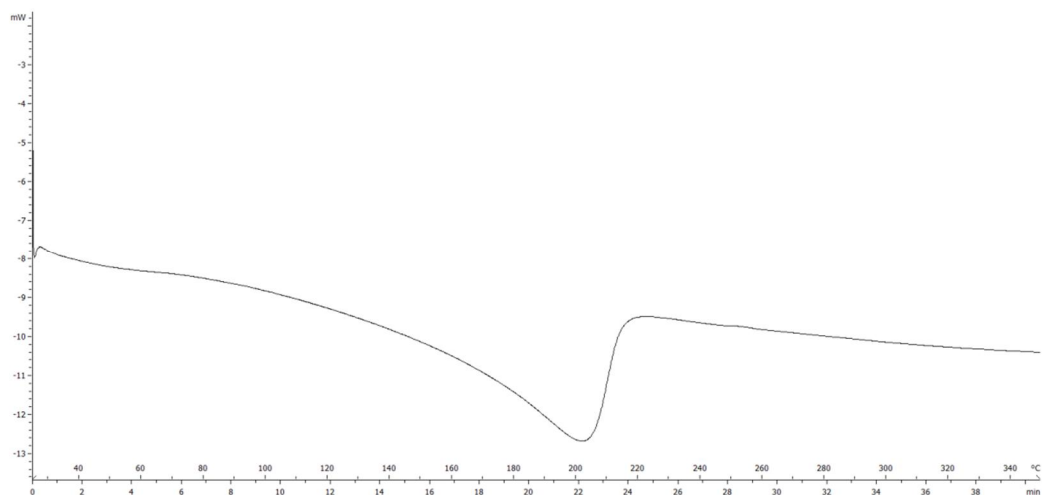


Figura 19 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes ao polímero PLGA (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e PLGA (vermelho).

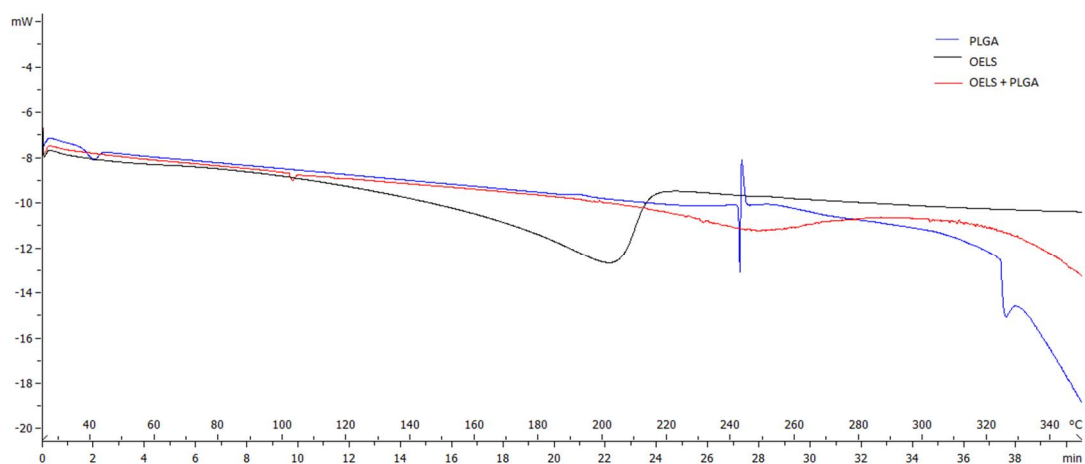


Figura 20 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes ao polímero poloxamer (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e poloxamer (vermelho)

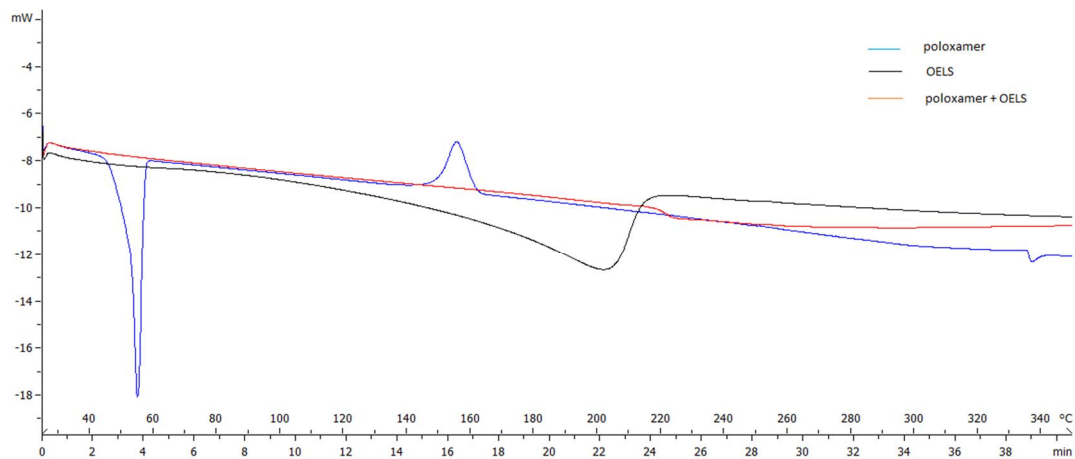


Figura 21 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes a fosfatidilcolina (azul), OELS (preto), e a mistura física 1:1 de OELS e fosfatidilcolina (vermelho)

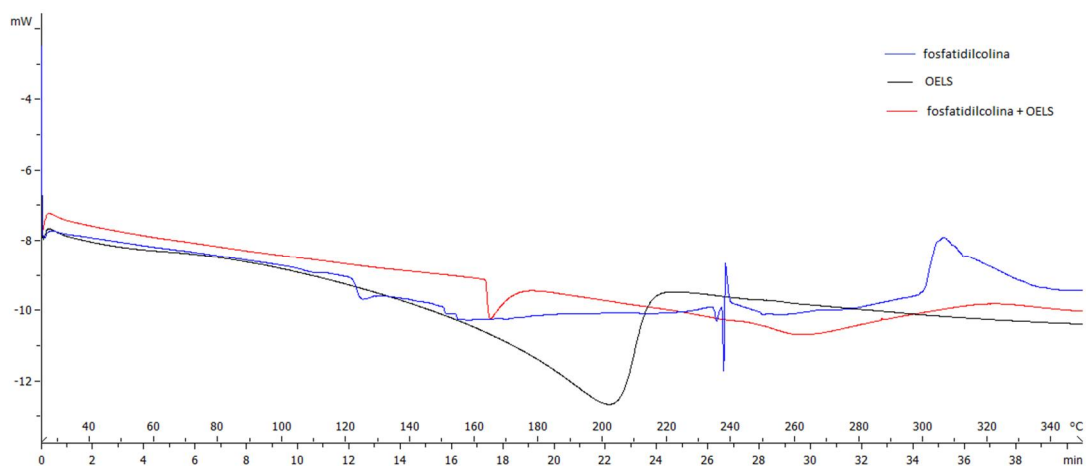


Figura 22 - Análise comparativa das curvas de DSC referentes à NCLS (azul), óleo essencial OELS (preto), e a mistura física dos componentes das NCLS (vermelho).

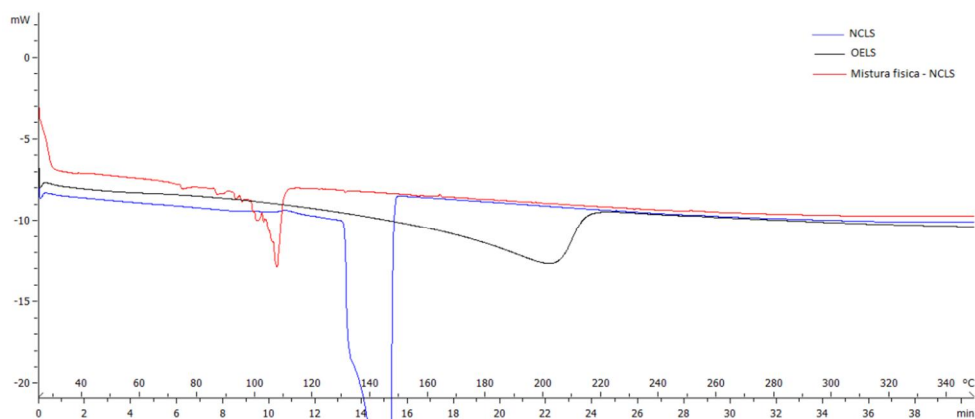


Tabela 21 - Relação entre substâncias e eventos apresentados nas curvas termoanalíticas de DSC.

Substancia	Eventos
OELS	202,28°C (endotérmico)
Poloxamer	55,32°C (endotérmico) 150,6°C (exotérmico) 338,31°C (endotérmico)
Poloxamer + OELS	240,81°C (endotérmico)
Fosfatidilcolina	128,63°C(endotérmico) 197,36°C(endotérmico) 236,0°C (endotérmico) 236,14°C (exotérmico) 317,7 (exotérmico)
Fosfatidilcolina + OELS	164,42°C (endotérmico)
PLGA	41,08°C (endotérmico) 242,82°C(endotérmico) 242,86°C(exotérmico) 334,27°C(endotérmico)
PLGA + OELS	102,68°C (endotérmico) 237,74°C (endotérmico)
NCLS	131,67°C (endotérmico)
Mistura física de NCLS	73,47 °C (endotérmico) 88,69°C (endotérmico) 107,41 °C (endotérmico)

Como pode ser observado na figura 18 o OELS apresentou um pico endotérmico em 202,28°C, provavelmente referente à evaporação dos componentes, pois os compostos majoritários timol (65%) e o-cimeno (17%) possuem pontos de ebulição a 232,5°C e 178°C respectivamente.

Na análise do termograma do PLGA puro podemos observar um evento endotérmico caracterizado pela descontinuidade da linha de base referente à transição vítrea do polímero, que ocorre a 41,08°C. Na mistura de PLGA e OELS este evento ocorre em 102,68°C (figura 19).

A temperatura de transição vítrea (T_g) é um evento térmico que ocorre quando o polímero passa do estado vítreo, onde se apresenta duro, rijo e quebradiço, para um estado mais maleável (plástico), sem que isso cause modificação estrutural. No termograma a T_g aparece como uma descontinuidade da linha de base, sendo algumas vezes tão sutil que sua visualização se torna difícil (Marco, 2009). Os resultados referentes a T_g do PLGA puro obtidos neste estudo estão em concordância com outros autores que encontraram T_g para o PLGA entre 37 - 54°C (Erbetta et al., 2011; Santanta et al. 2008; Makadia & Siegel, 2011). Alterações na T_g podem ser decorrentes de diferenças na massa molar da cadeia polimérica, visto que copolímeros de menor massa molar degradam mais rapidamente (Erbetta et al., 2011).

Segundo de Oliveira e colaboradores (2013) é possível que ocorram fortes interações fármaco-polímero através de ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila (OH) de fármacos e a carbonila do PLGA, o que em sistemas amorfos leva a um aumento tanto na entalpia de relaxamento quanto na T_g do polímero. O PLGA utilizado neste estudo pode ser considerado amorfo pois a proporção lactideo /glicolideo é de 50:50, e vários autores referenciam que copolímeros PLGA contendo menos que 85% de glicolideo são amorfos (Makadia & Siegel, 2011; Erbetta et al., 2011). Além disso o termograma obtido para o PLGA puro apresentou, da mesma forma que em outros trabalhos, apenas eventos térmicos referentes as temperaturas de transição vítrea (40°C) e degradação (242-344°C), reforçando a natureza amorfa do material (Santana et al., 2008; Erbetta et al., 2011; de Oliveira et al., 2013). Em vista disso podemos sugerir que o componente majoritário do OELS, o timol, que possui em sua estrutura um

grupamento hidroxila é o responsável pela forte interação entre o PLGA e o OELS, que leva a alterações na Tg do polímero de 41°C para 102°C.

Na figura 20 podemos observar dois eventos térmicos no termograma do poloxamer: um pico endotérmico a 55,32°C, referente à temperatura de fusão do tensoativo polimérico (Walker et al., 2007), e um pico exotérmico a 150°C. Já no termograma da mistura binária 1:1 de poloxamer e OELS aparece apenas um pico endotérmico a 240,81°C. Estes resultados indicam que houve uma interação a nível molecular entre o OELS e o poloxamer, e que esta interação favoreceu a estabilidade térmica da mistura. Resultados semelhantes foram obtidos por Fattahpour et al. (2015) estudando o comportamento térmico de nanopartículas de meloxicam em sistema composto de alginato quitosana e pluronic.

Na análise dos termogramas da fosfatidilcolina pura e da mistura 1:1 de fosfatidilcolina e OELS (figura 21) também podemos observar um deslocamento no pico endotérmico de 128,63°C para 164,42°C, respectivamente.

O deslocamento dos eventos endotérmicos para temperaturas mais elevadas que são observados na mistura binária entre o OELS e cada um dos excipientes que compõe as nanocápsulas nos permite inferir que o OELS interage com cada componente individual de modo a favorecer a estabilidade térmica.

No entanto o termograma da mistura física de todos os componentes é caracterizado por eventos endotérmicos em 73,47, 88,69 e 107,41°C (figura 22), temperaturas inferiores as das misturas binárias avaliadas, o que pode ser reflexo das diferentes proporções dos componentes na mistura física, em relação às misturas binárias. A mistura física possui a proporção de 2 : 1,7 : 1 : 0,4 de poloxamer, OELS, fosfatidilcolina, PLGA, respectivamente, ou seja a mesma proporção das NCLS. Além disso podem estar acontecendo interações entre o PLGA, poloxamer e fosfatidilcolina que geram modificações nas propriedades térmicas da mistura. Por outro lado, quando todos os componentes estão organizados na forma de nanocápsulas, ocorre um evento endotérmico caracterizado por um único pico em 131,67°C (figura 22), o que sugere que o processo de encapsulação confere uma maior estabilidade térmica aos componentes, em relação à mistura física. Segundo de Oliveira et al., (2013) as diferenças entre os eventos térmicos que ocorrem entre misturas físicas e

nanopartículas de PLGA carregadas com o ativo podem ser atribuídas ao estado de agregação dos componentes nas amostras.

Além disso, a ausência do pico endotérmico do OELS a 202°C no termograma das NCLS nos permite inferir que o óleo está dentro das nanocápsulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Jose et al. (2016), estudando nanopartículas de carboplatina constituídas de PLGA e PVA, onde através dos termogramas de DSC foi possível sugerir o encapsulamento do ativo dentro dos nanocarreadores.

Em um outro trabalho envolvendo a encapsulação do OELS em nanopartículas de angico e quitosana, os termogramas de DSC evidenciaram que as interações entre as moléculas de quitosana e do OELS levavam a uma diminuição da estabilidade térmica do sistema (Paula et al., 2010).

Em vista dos resultados obtidos podemos inferir que a técnica de DSC aplicada as NCLS apontam para uma interação favorável entre excipientes e ativos, de forma a contribuir para a estabilidade do nanossistema.

5.4.5 Caracterização quanto às propriedades vibracionais: Análise por microscopia Raman

A medição de Raman envolve essencialmente um laser de um certo comprimento de onda dirigindo e focalizado sobre uma amostra, ao entrar em contato com a amostra o equipamento registra o perfil de energia da luz que dispersa a partir da estrutura química da amostra. Desta forma cada composto gera um único espectro (que surge da excitação dos modos vibracionais da molécula) e para amostras contendo mais de uma substância os espectros são o resultado da superposição dos sinais de cada um dos constituintes (Walker et al., 2007)

O OELS, componente ativo das NCLS, é composto principalmente de monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), estando também presente sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$). Este óleo possui como componentes majoritários timol (65%) ($C_{10}H_{16}O$), o-cimeno (17%) ($C_{10}H_{14}$), e e-cariofileno (4%) ($C_{15}H_{24}$), conforme demonstrou análise por GC-MS no presente estudo. O espectro Raman do OELS (Figura 23), ratifica o perfil encontrado nas análises por GC-MS, onde o componente majoritário timol pode ser identificado pela presença de uma banda proeminente a 740 cm^{-1} , referente à

deformação do anel benzênico presente em sua estrutura, como já descrito por outros autores (Jentzsch et al, 2015; Daferrera et al 2002).

O espectro de PLGA apresentou bandas em 2945 cm^{-1} correspondente ao estiramento do alcano C-H, uma banda em 1780 cm^{-1} devido ao alongamento da ligação C-O do carbonilo, e bandas entre 810 e 882 cm^{-1} referentes à flexão C-H do alqueno. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Sankar et al. (2015), que avaliou o espectro de raman do PLGA livre e associado a nanopartículas contendo ácido hidroxâmico suberoilânilda.

O espectro da fosfatidilcolina apresentou bandas características na região de 1657 cm^{-1} referente a vibrações de estiramento Z-C=C de gorduras insaturadas, banda em 1442 cm^{-1} referente à vibração tipo tesoura em CH₂, em 1300 cm^{-1} referente à torção de CH₂, e vibrações de deformação no plano =C-H em 1267 cm^{-1} . O perfil encontrado neste estudo condiz com os achados de Czamara et al. (2014).

O espectro do poloxamer 407 apresentou uma banda característica em 1482 cm^{-1} referente a vibração de deformação do metileno CH₂, esta mesma banda também foi observada por Hasegawa et al. (2015), que analisou o espectro de raman do poloxamer em estado sólido.

No espectro das NCLS foi possível identificar claramente a banda característica de timol a 740 cm^{-1} , referente à presença de OELS na formulação. Já nas NCB o espectro evidencia bandas na faixa de 842 e 882 cm^{-1} referente ao PLGA, 1482 cm^{-1} correspondente ao poloxamer e 1657 cm^{-1} referente à fosfatidilcolina.

No espectro da NELS, que consiste na formulação de NCLS sem adição do polímero de revestimento PLGA, a banda referente à deformação do anel benzênico do timol 740 cm^{-1} pode ser observada claramente, porém comparando os espectros das NCLS e NELS verifica-se que ambos apresentam bandas muito parecidas, não sendo possível a distinção entre as duas formulações (figura 23 B).

Jentzsch, Ramos, Ciobotã, (2015) avaliando o espectro de raman de diversos óleos essenciais encontrou que a maioria dos óleos essenciais podem ser identificados de maneira rápida, apenas pela avaliação visual de seus espectros. Contudo verificou também que alguns óleos como o óleo de laranja doce e o óleo de laranja amarga, que possuem um componente em comum em proporção muito alta, as bandas deste componente dominam o espectro raman de ambas as espécies, e

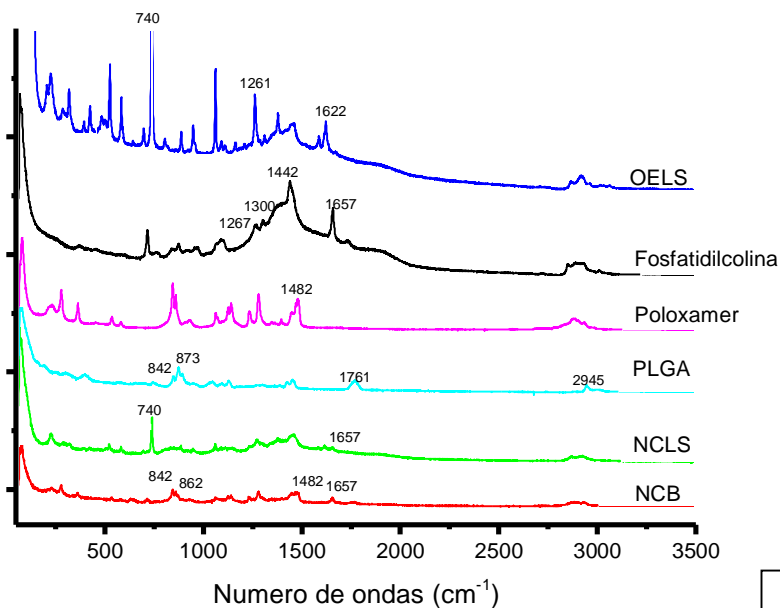
outras bandas menores que poderiam diferencia-las tendem a ser mascaradas ou ficam fracas demais para serem apreciadas em uma rápida inspeção visual dos espectros.

Situação semelhante ocorre com as formulações de NCLS e NELS, visto que possuem os mesmos constituintes e na mesma proporção, com exceção do PLGA que está presente apenas nas NCLS. E considerando que o PLGA dentre todos os componentes é o que está em menor quantidade na formulação, podemos inferir que o sinal de raman referente a este polímero foi mascarado pelos demais componentes da formulação de NCLS, em especial pelo ativo, o OELS, que possui uma resposta raman bastante intensa.

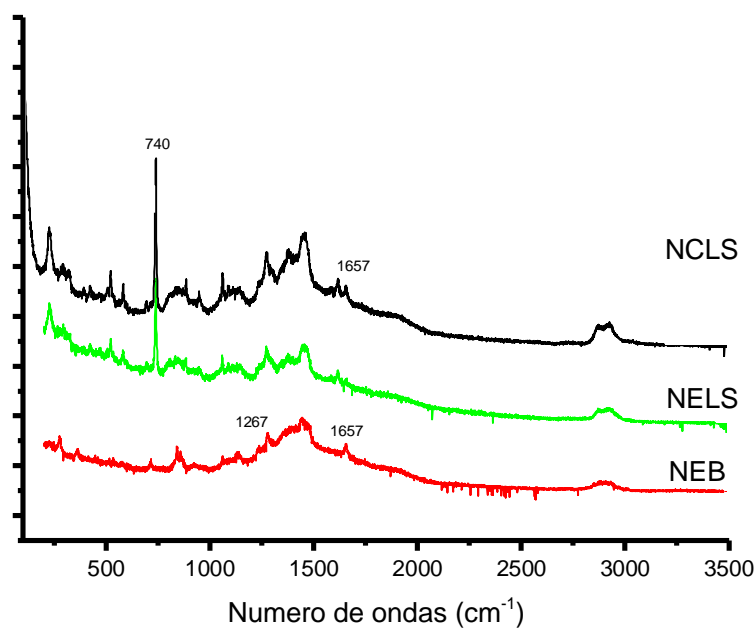
Em contrapartida o espectro raman das formulações branco, ou seja, sem adição do OELS, tanto as nanocápsulas (NCB), quanto a nanoemulsão (NEB) apresentaram bandas características dos excipientes que permitiram diferencia-las, conforme pode ser observado na figura 23 A e B. Nas NCB aparecem nitidamente as bandas na região de 842 e 882 cm^{-1} , que correspondem ao polímero PLGA, em 1482 cm^{-1} relativo ao poloxamer, e em 1657 cm^{-1} referente à fosfatidilcolina. Já na NEB o espectro evidencia as bandas 1267 e 1657 cm^{-1} , ambas correspondentes a fosfatidilcolina.

Desta forma pelos resultados apresentados podemos considerar que a análise por micro-Raman é uma técnica rápida, prática e eficaz para caracterização dos nanosistemas contendo OELS desenvolvidos nesta pesquisa. E que embora não seja eficaz na distinção entre nanocápsulas e nanoemulsão carregadas com o ativo OELS, se apresenta como uma importante ferramenta que pode ser utilizada na análise qualitativa desses nanosistemas.

Figura 23 - Espectro Raman dos componentes isolados e dos nanosistemas. (A) OELS (óleo essencial de *L. sidoides*), fosfatidilcolina, poloxamer 407, PLGA, NCLS (nanocápsulas contendo OELS), NCB (nanocápsulas sem OELS); (B) comparação entre os espectros das NCLS (nanocápsulas contendo OELS), NELS (nanoemulsão contendo OELS), NEB (nanoemulsão sem OEL



A



B

5.5 Estudos de estabilidade dos nanosistemas (nanocápsulas) produzidas com OELS

As NCLS foram submetidas à avaliação da estabilidade por um período de 360 dias a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), onde foram monitorados os parâmetros de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e teor de ativo. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 22.

Em relação à aparência macroscópica as formulações se mantiveram inalteradas, sem sinais de separação de fases, cremeação ou sedimentação durante os 360 dias de estudo. Segundo Schaffazick et al., (2003), nas suspensões coloidais, o processo de sedimentação é lento para partículas de tamanho reduzido, assim fenômenos como separação de fase são minimizados, além disso o movimento browniano favorece o processo de estabilização do sistema (Tadros et al., 2004).

Componentes da formulação também podem contribuir para a estabilidade física, como é o caso do poloxamer, que é um tensoativo polimérico conhecido pela habilidade em evitar a agregação de moléculas por impedimento estérico (Hasegawa et al., 2015; Bonacucina et al., 2011).

Podemos observar um aumento no tamanho e PDI das partículas ao longo do tempo, que foi discreto nos primeiros 120 dias, e pronunciado após 180 e 360 dias (tabela 22). O aumento no tamanho das partículas ao longo do tempo é fenômeno bem conhecido e descrito na literatura e se deve principalmente a fenômenos de transporte de massa quando se trata de nanoemulsão ou agregação em se tratando de nanocápsulas e nanoesferas (Beck, Guterres, Pohlmann., 2011). Altos índices de polidispersão indicam heterogeneidade no tamanho das partículas em suspensão, já a variação na polidispersão ao longo do tempo indica a formação de uma população de partículas com tamanhos que não existiam inicialmente, possivelmente resultado de agregação quebra ou degradação (Moraes, 2010). O aumento do PDI observado neste estudo pode sugerir a presença de partículas de diferentes composições, como nanocápsulas, micelas e glóbulos. Um fato que reforça esta hipótese é que o polímero de revestimento utilizado, o PLGA 50:50, é dentre a classe de copolímeros glicolideo/lactideo o que mais rapidamente sofre degradação (Makadia & Siegel, 2011).

A degradação da parede polimérica das nanocápsulas pode levar o sistema a se estabilizar na forma de glóbulos, devido ao teor de tensoativos presentes no meio, estes envolveriam o conteúdo lipídico do OELS, formando nanoemulsão. Uma parte das nanocápsulas, no entanto, podem se romper com a perda da parede polimérica, liberando o OELS, que devido a sua baixa pressão de vapor sofre volatilização, o que justificaria também a diminuição do teor de ativo, que decaiu de $3,17 \pm 2,51$ mg/mL no primeiro dia para $2,62 \pm 1,65$ mg/mL em 360 dias (tabela 22). Além disso a desestruturação física das nanocápsulas levaria a liberação dos tensoativos fosfatidilcolina e poloxamer no meio. Estes tensoativos livres, se organizariam na forma de micelas o que poderia explicar a diminuição na média de tamanho das partículas observada após 180 e 360 dias.

O comportamento do potencial zeta corrobora com a hipótese formulada, visto que a média do valor passou de $-23,8 \pm 3,73$ mV no primeiro dia, decaindo para $-16,66 \pm 8,10$, em 180 dias e $-9,66 \pm 10,76$ em 360 dias. A presença de fosfatidilcolina favorece um potencial zeta mais negativo como já foi observado em vários estudos (Weiss-Angeli et al., 2008; Silva, Louchard, Leal, 2014, Valcourt et al., 2016). Desta forma a variação do potencial zeta ao longo do tempo pode ser devido à progressiva formação de outras estruturas nanométricas no sistema, como nanoemulsão e micelas. Estas novas estruturas por possuírem constituição distinta, também possuem cargas de superfície distintas, impactando conforme sua abundancia, no potencial zeta geral. Outro fator importante que contribui para alterações do potencial zeta são modificações no valor do pH. No presente estudo observa-se que houve uma crescente acidificação do meio, visto que o pH inicial das NCLS no primeiro dia era de $4,74 \pm 1,26$, alterando para $3,43 \pm 4,24$ em 180 dias, e chegando a $2,83 \pm 4,93$ em 360 dias. Esta alteração no valor do pH do meio foi causada possivelmente pela degradação do PLGA, que gera como subprodutos o ácido lático e o ácido glicólico (Erbetta et al., 2010; Makadia & Siegel, 2011). A presença de eletrólitos contribui para um menor potencial zeta em módulo (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari 2010), o que explicaria a expressiva diminuição do valor em 180 e 360 dias.

Tabela 22 - Parâmetros avaliados na estabilidade das NCLS.

Tempo (dias)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Doseamento mg timol/mL de nanocápsulas	pH
1	201,7 ± 0,28	0,20 ± 2,71	-23,8 ± 3,73	3,17 ± 2,51	4,74 ± 1,26
30	197,3 ± 0,77	0,22 ± 6,20	-24,96 ± 4,94	3,03 ± 0,95	4,70 ± 4,00
60	199,3 ± 1,04	0,22 ± 4,28	-31,03 ± 4,66	2,97 ± 3,08	3,80 ± 0,80
90	208,7 ± 0,55	0,22 ± 3,40	-32,8 ± 2,19	2,82 ± 2,15	3,88 ± 2,29
120	212,4 ± 0,27	0,24 ± 2,20	-21,73 ± 3,21	2,95 ± 3,01	3,68 ± 4,02
180	149 ± 3,35	0,35 ± 6,8	-16,66 ± 8,10	2,76 ± 1,15	3,43 ± 4,24
360	74,83 ± 0,98	0,50 ± 2,83	-9,66 ± 10,76	2,62 ± 1,65	2,83 ± 4,93

Resultado referente a media ± DPR de três repetições

Diante dos resultados obtidos as NCLS mostraram um comprometimento de sua estabilidade a partir de 180 dias. Observando a natureza dos componentes da formulação o padrão de estabilidade das NCLS foi o comparável a outros sistemas que empregaram constituintes de natureza química semelhante (Flores et al., 2012; Moraes et al., 2010; Dalmolin et al., 2016; Pinto et al., 2016).

Alguns estudos (Monteiro et al., 2007; Alves et al., 2003; Costa et al., 2011; Bersan et al., 2014; Veras et al., 2014) tem demonstrado o potencial antimicrobiano e antioxidante do OELS e seus constituintes químicos. Neste sentido foi investigado se a nanoencapsulação interfere nessas propriedades do OELS.

5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana do OELS e das NCLS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

A atividade antimicrobiana do OELS tem sido bastante documentada.

Estudo realizado por Castro et al. (2011), com OELS extraído de plantas coletadas em Montes Caros-MG, demonstrou atividade contra *S. aureus* e *E. coli* isoladas de queijo minas artesanal. A Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi de 13 µL/mL, e 25 µL/mL, respectivamente, para ambas as bactérias.

Bersan et al. (2014) verificou que o OELS obtido por hidro destilação e contendo como componentes majoritários timol (65,76%), p-cimeno (17,28%), e ácariofileno (10,48%), apresentou para *C. albicans* (CIM 250 e CBM 500 µg/mL), *F. nudeatum* (CIM 125 e CLM 125 µg/mL), *P. gingivalis* (CIM 250 e 250 µg/mL), e para *S. sanguis* (CIM 125 e CBM 500 µg/mL).

Na avaliação da atividade antimicrobiana do OELS contra *S. aureus* isolado de pacientes que apresentavam resistência a antibióticos convencionais (ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefaclor, cefadroxil, cefalexina, clindamicina, cloritromicina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, gatifloxacina, oxacilina, penicilina), foram observados halos de inibição de 15 – 21 mm (utilizado 20 µL de óleo por disco), e uma CIM de 0,4 µL/mL (Oliveira et al., 2006a). O OELS mostrou ação antibacteriana também para *E. Coli* (CBM: 320 µL/mL) e *S. aureus* (CBM: 20 µL/mL) (Costa et al., 2011), e mais recentemente Veras et al., (2013) avaliando o OELS tendo como compostos majoritários timol (84,9%), etil-metil-carvacrol (5,33%) e p-cimeno (3,01%), verificou que tanto o OELS quanto o timol mostraram uma ação antimicrobiana comparável para *S. aureus*, com uma CIM em torno de 128 µg/mL.

Diante do exposto, foi investigado se a encapsulação do OELS causava interferência no seu potencial antibacteriano. Para tanto, foi utilizado como modelo para este ensaio o microrganismo *S. aureus*, devido ao seu histórico de sensibilidade ao OELS.

Na tabela 23 e Figura 24 pode ser observado que as CIMs das NCLS e do OELS foram iguais (70 µg/mL), e bem superior ao fármaco padrão (amicacina: 4,3 µg/mL); enquanto a encapsulação aumentou (2x) a CBM (280 µg/mL) do OELS em relação a este livre (140 µg/mL). As NCB foram avaliadas nas mesmas

concentrações das NCLS, e não produziram nenhum efeito sobre o crescimento microbiano, demonstrando que não há influência dos componentes da formulação sobre o efeito antimicrobiano das NCLS.

Tabela 23 - Resultados referentes ao ensaio de CIM e CBM de NCLS e OELS frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

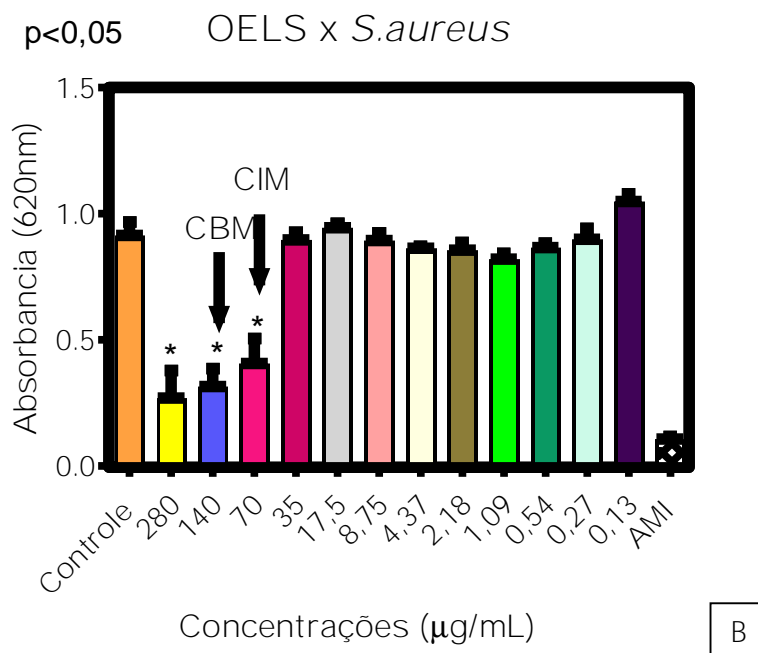
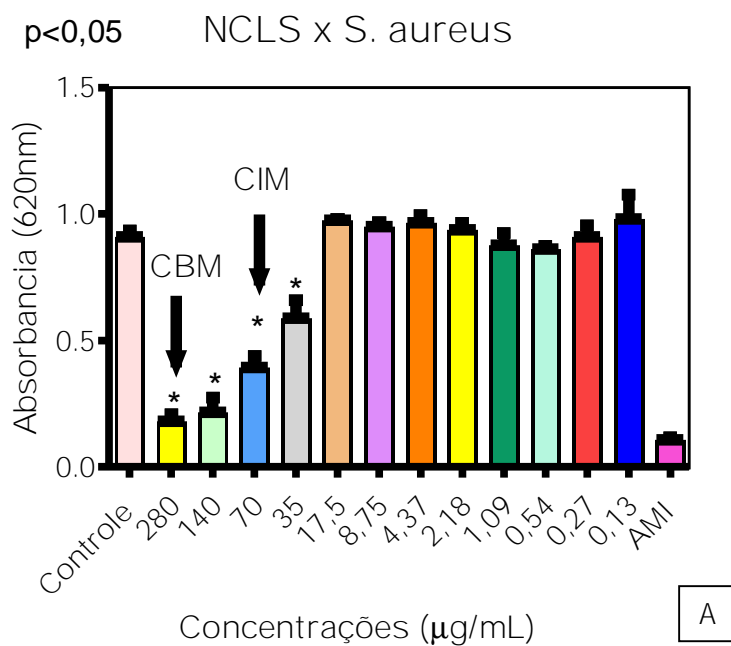
Amostras	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CBM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
NCLS	70	280
NB (sem ativo)	-	-
OELS	70	140
Amicacina	4,3	4,3

* - sem atividade antimicrobiana na faixa de concentração utilizada

Se considerarmos as CIMs do OELS para *S. aureus* determinadas em estudos anteriores, como Veras et al (2013) (OELS – CIM: 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a CIM do OELS e das NCLS foram comparáveis a este, porém tanto o OELS quanto consequentemente as NCLS avaliadas no presente estudo mostraram que parece ser necessária uma menor concentração destes para uma ação bactericida em relação a estudo anterior, Veras et al. (2013).

Variações no potencial biológico de óleos essenciais são muito descritas na literatura científica, considerando que essas classes de metabólitos secundários podem apresentar variações químicas importantes na sua constituição, propiciada por uma série de fatores como sazonalidade, horário de colheita, características genéticas, dentre outros (Bakkali et al., 2008). Dessa forma, diferenças no potencial antimicrobiano do OELS para *S. aureus* descritos na literatura (Veras et al., 2013; Costa et al., 2011; Oliveira et al., 2006a; Castro et al., 2011) em relação ao presente estudo, se devem possivelmente a variações quali e quantitativas dos constituintes químicos dos óleos estudados. Nesse contexto, destaca-se que o fato de muitos autores não realizarem análise da composição química do óleo essencial comprometendo avaliações/comparações mais minuciosas.

Figura 24 - CIM e CBM frente à cepa *S. aureus* ATCC 6538P (A) nanocápsulas contendo óleo essencial de *L. sidoides*- NCLS; (B) Óleo essencial de *L. sidoides* – OELS



A atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais depende essencialmente da natureza química de seus constituintes (Teixeira et al., 2013; Vancourt et al., 2016). Substâncias que possuem um fenol ou grupamento alcoólico, com pelo menos uma dupla ligação, como o timol e carvacrol (presentes no OELS) demonstraram promover efeitos inibidores sobre o crescimento microbiano (Griffi et al., 1999; Dorman e Deans, 2000).

Timol e carvacrol (isômero constitucional do timol) possuem atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas e gram-negativas similar, o que significa que a posição do grupo hidroxila não influencia nesta atividade (Botelho et al., 2007; Rosa et al., 2015). Contudo Chorianopoulos et al. (2004) afirmam que em muitos óleos essenciais a atividade antimicrobiana não está apenas relacionada à presença de timol e carvacrol, mas outros componentes em baixas concentrações podem interagir provocando ações aditivas ou antagônicas no efeito antimicrobiano. Ademais, segundo Ultee et al. (2000), o p-cimeno, que é um dos compostos majoritários presente em grande parte dos OELS não possui ação antimicrobiana se usado sozinho, mas quando combinado com carvacrol, ocorre sinergismo entre os dois e a atividade antimicrobiana do carvacrol é potencializada.

A interação entre p-cimeno e carvacrol, está relacionada ao fato do p-cimeno facilitar o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana (Burt, 2004). Em virtude de timol e carvacrol serem isômeros, é possível que o p-cimeno atue facilitando o transporte também de timol através da membrana da célula bacteriana. Desta forma o efeito antimicrobiano apresentado pelos OELS contendo p-cimeno, timol e/ou carvacrol como constituintes majoritários, podem ser superiores em relação aos que não possuem p-cimeno, em sua constituição, o que é o caso do OELS avaliado neste estudo.

A veiculação de óleos essenciais com potencial antimicrobiano em nanocarreadores tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa, em virtude dos benefícios que a nanotecnologia pode agregar, como controle da liberação do ativo, possibilidade de direcionamento ao alvo e diminuição da toxicidade (Rosa et al., 2015; Valcourt et al., 2016; Botelho et al., 2016).

No presente estudo foi observado que o encapsulamento do OELS não interferiu na atividade antimicrobiana do OELS, que apresentou a mesma CIM tanto para o OELS quanto para as NCLS (tabela 23). Em trabalho semelhante Montagu

et al., (2014) também não encontrou diferença entre a CIM de nanocápsulas lipídicas contendo os terpenos carvacrol, eugenol e cinamaldeído e a mistura dos componentes livres, ambas apresentaram CIM de 310 µg/mL.

No entanto em relação a CBM, o valor encontrado para as NCLS foi o dobro em relação ao OELS. Esta diferença pode estar relacionada à taxa de liberação do ativo, ou a própria interação entre a nanopartícula e a célula bacteriana. Dessa forma, a encapsulação manteve a ação antimicrobiana da planta, e criou possibilidade de vantagens terapêuticas.

Sabe-se que devido à natureza complexa dos óleos essenciais, estes não possuem um alvo específico nas células. Sua natureza lipofílica facilita a penetração através da membrana celular, promovendo um desequilíbrio no transporte dos íons e solutos. Este processo leva a perda de íons e a redução do potencial de membrana, com consequente colapso da bomba de prótons, levando a depleção de ATP e consequente morte celular por apoptose e necrose (Yoon et al, 2000; Montagu et al., 2014; Bakkali, 2008).

Estudo realizado por Veras et al. (2013), mostrou que o OELS e o timol em concentrações sub inibitórias interferiram nos aminoglicosídeos e na atividade da β-lactamase de bactérias gram-positivas e gram-negativas. No presente estudo, é possível que pelo menos parte dessas ações possam estar relacionadas ao potencial antimicrobiano mostrado pelo OELS e NCLS, porém estudos adicionais são necessários para ratificar essa hipótese.

5.7 Avaliação do efeito do OELS, TIMOL e NCLS em neutrófilos humano mensurado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT.

5.7.1 Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)

Na figura 25 A pode ser observado que o OELS (5 – 100 µg/mL) após 30 minutos de incubação promoveu o aumento da atividade da LDH nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, ($44,67 \pm 2,11$ e $58,77 \pm 5,46$ %) quando comparado ao grupo controle (DMSO 1%; $24,90 \pm 1,60\%$). A incubação das células com o TIM (1, 10, 50 e 100 µg/mL) não promoveu aumento significativo da atividade LDH ($6,60 \pm 1,23$; $6,24 \pm 0,83$; $5,85 \pm 0,89$; $7,15 \pm 1,20$ %) em relação ao grupo controle (DMSO 1%;

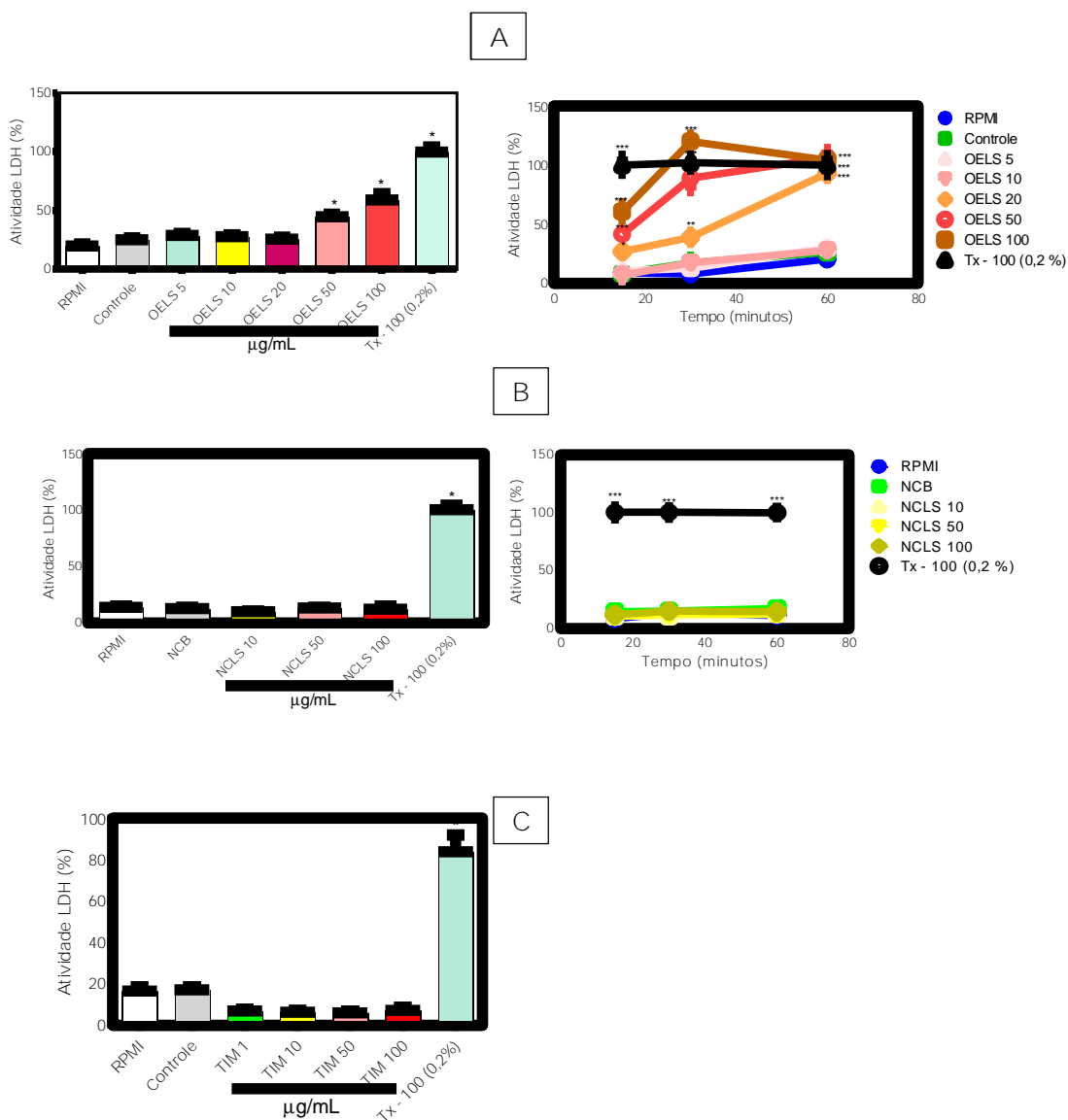
24,90 ± 1,60%) (figura 25 C). As NCLS, entretanto, utilizando o óleo essencial nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL não promoveram o aumento da atividade da LDH (9,32 ± 0,86; 13,01 ± 0,41 e 11,73 ± 2,48%, respectivamente) (figura 25B), o que indica ausência de toxicidade, quando comparada ao controle (NCB-nanocápsulas branca, sem OELS: 12,01 ± 1,61%).

Considerando que a nanoencapsulação de um ativo prevê a liberação controlada deste, foi investigado então a possível toxicidade do ativo (OELS) livre e encapsulado, incubado por um período superior a 30 min, e mensurada pela atividade da LDH. Na figura 25 A pode ser observado que a adição de concentrações crescentes do OELS promoveu nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL) um aumento significativo da atividade da enzima LDH a partir de 15 minutos de incubação (OELS: 44,67 ± 2,11 e 58,77 ± 5,46%, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (DMSO 1%: 7,54 ± 0,41%).

Por outro lado, a incubação das NCLS (10, 50 e 100 µg/mL) por 15 – 60 min em neutrófilos não aumentou significativamente a atividade da LDH (60 min: 12,20 ± 0,88; 11,85 ± 1,18 e 14,31 ± 0,99%, respectivamente) em relação ao grupo controle (NCB nanocápsulas sem OELS: 16,76 ± 1,52%) (figura 25 B). Resultados semelhantes foram observados para o timol, incubado por 30 min, que não aumentou a atividade da LDH em nenhuma das concentrações investigadas (1 – 100 µg/mL).

A avaliação da toxicidade do OELS com emprego de uma curva tempo resposta, permitiu detectar, que este é tóxico nas concentrações acima relacionadas desde o tempo de incubação de 15 min, e não apenas a partir de 30 min, como inicialmente observado. Esse resultado foi corroborado por estudo anterior (Ferraz et al., 2013), que demonstrou a citotoxicidade OELS, em outro tipo celular, como hepatócitos humano (linhagem HepG2).

Figura 25 - Avaliação da toxicidade do OELS (A), NCLS (B), e do TIM (C) em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com OELS (5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL), TIM (1, 10, 50 e 100 µg/mL) ou NCLS (10, 50 e 100 µg/mL) e após 15, 30 e 60 minutos foi mensurada a atividade da LDH. RPMI: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: DMSO 1% (A e B) ou formulação vazia - NCB (C). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

No presente estudo, as NCLS não mostraram citotoxicidade em neutrófilos mensurada pela atividade da LDH. Esses resultados estão possivelmente relacionados a uma liberação controlada dos ativos contidos no nanosistema, em concentrações seguras. Dessa forma, a incorporação do óleo essencial em sistemas nanométricos preveniu a citotoxicidade do OELS, expressa pelo aumento na atividade da LDH.

A análise de possível citotoxicidade de um novo fármaco, como por indução da necrose, tem sido investigada especialmente pela avaliação da integridade da membrana plasmática; que pode dar-se, por exemplo, pela medida da atividade da LDH. Trata-se de uma enzima citoplasmática, presente em quase todas as células, sendo liberada para o meio extracelular apenas quando a membrana plasmática é danificada (Chan, Moriwaki, De Rosa, 1973; Burd & Usategui-Gomes, 2013). Assim, diante dos resultados obtidos o aumento da atividade da LDH em neutrófilo humano induzida pelo OELS (50 e 100 µg/mL), está possivelmente relacionada à toxicidade deste sobre a membrana plasmática dessas células.

5.7.2 Teste do MTT

Na Figura 26 estão descritos os efeitos do OELS, timol e NCLS sobre a viabilidade de neutrófilo humano, avaliada através do teste do MTT. A adição do OELS à suspensão de neutrófilos causou, nas maiores concentrações (100 e 200 µg/mL) uma redução significativa da viabilidade celular ($43,36 \pm 1,56$; $76,56 \pm 2,40$ %; respectivamente) em relação ao grupo controle (DMSO 1 %). O timol (terpeno majoritário do OELS) também se mostrou citotóxico nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, causando reduções da viabilidade celular em torno de 90%. Por outro lado, as NCLS em nenhuma das concentrações investigadas (10, 50 e 100 µg/mL) reduziu significativamente a viabilidade celular, quando comparada as nanocápsulas branca (sem OELS)/grupo controle, que por sua vez, mostrou um padrão de viabilidade celular similar ao grupo RPMI (meio de cultura).

O teste do MTT é um método de avaliação da citotoxicidade rápido e sensível, onde a viabilidade celular é mensurada pela habilidade das desidrogenases mitocondriais reduzirem o sal de tetrazolium (MTT, cor amarela) a um sal de formazan, de cor roxa, sendo a intensidade desta cor proporcional a atividade

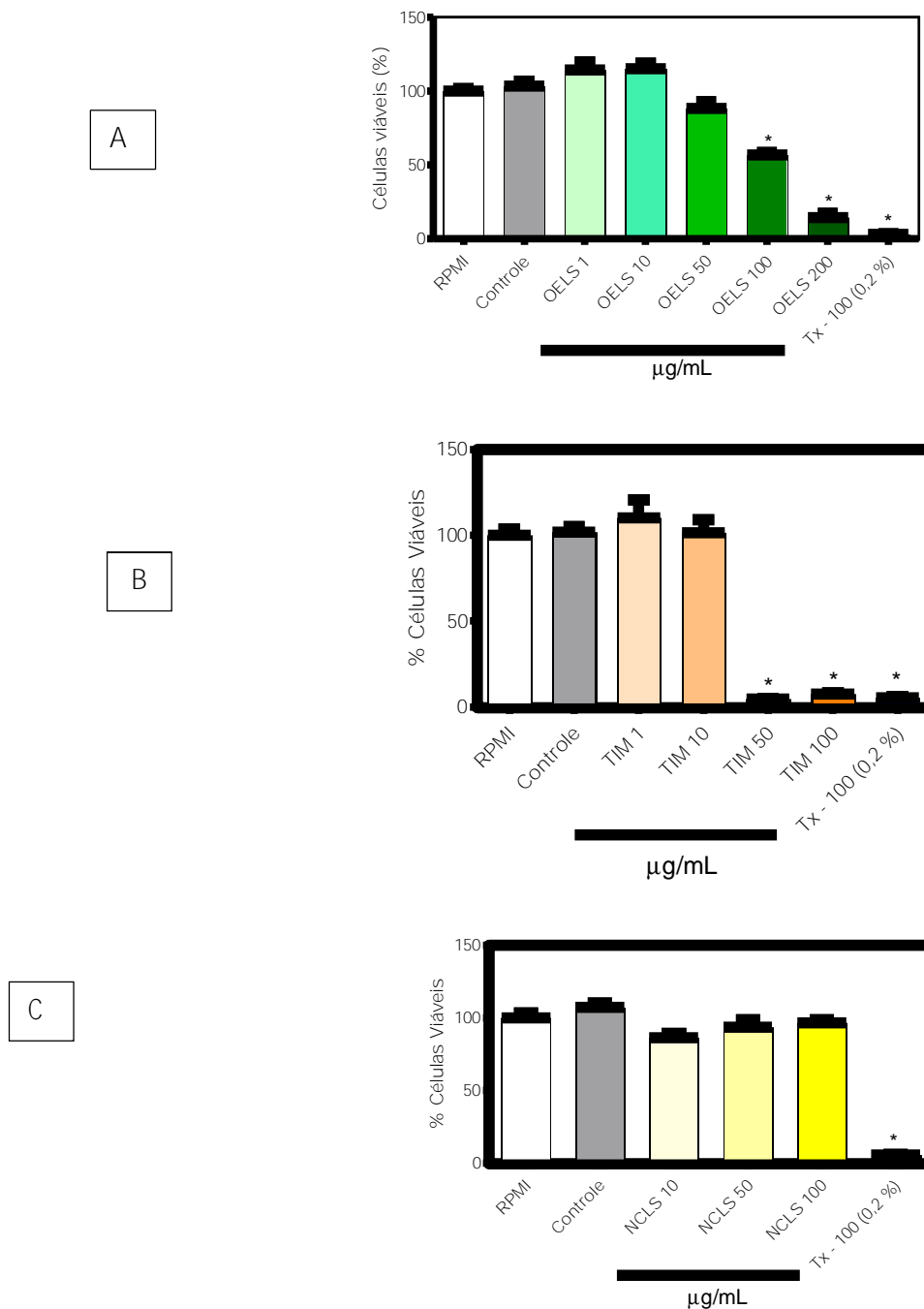
metabólica celular (VERMA et al., 2010). Assim, diante dos resultados obtidos a toxicidade relativa do OELS e do timol, parece estar relacionada há uma possível interferência no metabolismo celular.

A citotoxicidade do OELS e do timol em neutrófilo humano determinada no presente estudo, foi também observada em outros trabalhos (Borges et al., 2012; Gomide et al., 2013, Medeiros et al., 2011), envolvendo cultura primária ou linhagens celulares (HepG2, CT26.WT, CACO-2, CHO). Medeiros et al (2011) demonstraram a citotoxicidade do OELS (constituintes majoritários: timol/ 78 %, p-cimeno/ 6,3 % e e-cariofileno/ 6,2 %) pelo teste de MTT em macrófagos de camundongos, que mostrou uma CC50% de $217,3 \pm 30,1$ ug/mL, enquanto a CC50 do timol foi de $37,4 \pm 2,7$ µg/mL. Um outro estudo (Borges et al., 2012), também em macrófagos/camundongos observou uma citotoxicidade/MTT superior para o OELS (timol/ 78,4%, e-cariofileno/ 6,2% e 1-8-cineol/ 1,6%), que apresentou uma CC50 de $192,7 \pm 0,3$ ug/mL.

Em linhagem celular tumoral - CT26.WT, o OELS (timol/ 63%, o-cimeno/ 11% e alfa-humuleno/ 5%) avaliado pelo teste de MTT mostrou-se tóxico, com uma CC50 de 19,05 µg/mL, enquanto que para células normais - CACO-2 e CHO, o OELS nas concentrações testadas (0,1, 1, 10 e 100 µL/mL) não apresentou toxicidade (Gomide et al., 2013).

Importante destacar, que os estudos relacionados envolveram também o OELS das folhas da planta, mas, estes têm uma variabilidade qualitativa e quantitativa, especialmente em relação aos terpenos majoritários. Contudo, o OELS investigado nos estudos citados, incluindo o atual, possui algo em comum, a presença do timol como constituinte majoritário. Ademais, o OELS investigado por Gomide et al. (2013), mostrou uma interessante similaridade química com o OELS em estudo, apresentando o o-cimeno como segundo constituinte majoritário. Diante do exposto, a citotoxicidade do OELS parece estar relacionada, pelo menos em parte, a presença do timol, mas não podemos descartar a contribuição de outros terpenos também presentes na planta.

Figura 26 - Efeito de OELS (A), TIM (B) e NCLS (C) sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT



Efeito de OELS (A), TIM (B) e NCLS (C) sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com OELS, TIM ou NCLS (1 - 200 µg/mL) por 30 minutos e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. RPMI: células não tratadas; Tx: Triton X - 100 (0,2%, v/v) - padrão citotóxico; Controle: (A) e (B) DMSO 1 % (v/v); (C) NC sem OELS. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

A alteração do tamanho de uma partícula para a escala nanométrica pode ocasionar uma mudança nos parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), podendo influenciar tanto no potencial farmacológico quanto toxicológico dos produtos relacionados (Bowmeester *et al.*, 2009; Hagens *et al.*, 2007). Isso, sem considerar a liberação controlada de sistemas dessa natureza.

Os fosfolípidos (fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas e etanolaminafosfatídios) são uma classe de lípidos anfifílicos formados por uma cabeça hidrofílica (um grupo fosfato, um diglicerídeo e uma molécula orgânica simples) e uma cauda hidrofóbica (ácido graxo de cadeia longa) que formam espontaneamente lipossomas, micelas, ou estruturas de n-lamelares, dependendo da hidratação e da temperatura. Devido à sua facilidade de biodegradação e à sua semelhança com as biomembranas celulares, eles são menos tóxicos do que o polímero ou outros materiais de parede, sendo excelentes sistemas carreadores para uma variedade de aplicações e, em particular para óleos essenciais (LIOLIOS *et al.*, 2009; GIBBS *et al.*, 1999).

Os poloxâmeros, são tensoativos poliméricos, amplamente utilizados em preparações farmacêuticas devido suas propriedades de formação de gel termo sensíveis (Bonacucina *et al.*, 2007), e micelas que podem atuar como carreadores de fármacos pela inerente capacidade de encapsular drogas lipofílicas (Basak & Bandyopadhyay, 2013). A alta segurança toxicológica e biocompatibilidade em especial do poloxamer 407, faz desse tensoativo matéria prima de escolha no desenvolvimento de formulações para uso oral, parenteral e intramuscular (Fattahpour *et al.*, 2015; Hasegawa *et al.*, 2015; Boodhwani, *et al.*, 2006; Bonacucina *et al.*, 2011).

Diante do exposto, as características intrínsecas de um nanossistema composto de NCLS e a natureza da sua formulação, com emprego da fosfatidicolina e poloxamer 407 como tensoativos, por exemplo, podem ter contribuído pelo menos em parte com a ausência de toxicidade desse produto sobre a membrana plasmática e metabolismo dos neutrófilos humano.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram obtidos por Chen *et al.*, (2009), onde o eugenol e carvacrol apresentaram ação citotóxica expressiva em células 3T3 (fibroblastos de rato) em concentrações superiores a 0,31 µg/mL e 0,28 µg/mL, porém quando os ativos foram encapsulados em nanopartículas de quitosana, doses inferiores a 0,2 mg/mL não mostraram citotoxicidade.

A ausência de citotoxicidade apresentada pelas NCLS em neutrófilos humano, células protagonistas na resposta imune inata, e a observação de que somente em concentrações mais elevadas ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$) o OELS e/ou timol, mostraram citotoxicidade em neutrófilos, motivaram prosseguir os estudos das NCLS, avaliando seu potencial anti-inflamatório tópico.

5.8 Avaliação do potencial anti-inflamatório tópico das NCLS em camundongos

A figura 27 mostra o efeito das NCLS, OELS, NCB (nanocápsula branca, sem OELS) e indometacina (anti-inflamatório padrão) sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos. A administração tópica das NCLS (0,04; 0,08 e 0,33 μg de OELS/orelha) aumentou significativamente ($0,17 \pm 0,017$; $0,15 \pm 0,01$ e $0,12 \pm 0,008$ mm) o edema de orelha induzido por TPA (2,5 μL ; orelha) em relação ao grupo NCB (sem OELS, formulação igual a maior dose NCLS, 0,33 μg /orelha), que por sua vez de maneira não esperada, reduziu significativamente o edema ($0,08 \pm 0,009$ mm) em relação ao grupo veículo ($0,15 \pm 0,007$ mm). Em relação ao tratamento dos animais com OELS, foi observado que nas menores doses, este mostrou um efeito edematogênico (0,04 μg /orelha: $0,21 \pm 0,008$ mm), e na maior dose/0,33 μg /orelha ($0,14 \pm 0,006$ mm), não interferiu significativamente no edema em relação ao grupo veículo. A indometacina, inibidor não seletivo da COX, reduziu significativamente o edema de orelha em relação ao grupo veículo. Dessa forma, diante dos resultados obtidos foi investigado, se haveria alguma dose da NCB a ser empregada, que não interferisse no edema induzido por TPA em camundongos.

Na figura 28 pode ser observado que as NCB na dose comparável a NCLS 0,33 mg/orelha, apresentaram efeito antiedematogênico em relação ao grupo veículo/controle, confirmando o experimento anterior, no entanto os grupos NCB 0,04 e 0,08 mg/orelha ($0,13 \pm 0,006$ e $0,125 \pm 0,006$ mm, respectivamente) não apresentaram efeito edematogênico significativo em relação ao grupo veículo ($0,147 \pm 0,007$ mm). Esses resultados permitiram então, estabelecer a dose limite de NCB a ser empregada para o presente estudo, norteando também os grupos tratados com NCLS.

Um outro experimento foi proposto com o objetivo de avaliar se o componente de revestimento das nanocápsulas, o polímero PLGA apresentava ação

antiedematogênica nas condições empregadas. Na figura 27 pode ser observado que o tratamento tópico dos animais com PLGA (0,036 mg/orelha, $0,03 \pm 0,006$ mm) não apresentou atividade anti-edematogênica significativa em relação ao veículo ($0,04 \pm 0,005$ mm) mas reduziu em 15 % o edema de orelha induzido por TPA em camundongos. Tendo em vista que alguns trabalhos comprovaram a atividade anti-inflamatória e cicatrizante do PLGA quando em tamanho nanométrico (Chereddy et al, 2013; Guimarães et al., 2015) e como uma das características da nanotecnologia é mudar as propriedades dos materiais, é possível que o PLGA apresente ação anti-edematogênica apenas quando na estrutura das nanocápsulas.

Considerando que o componente majoritário do OELS é o timol e que este em alguns estudos apresentou ação anti-inflamatória comparável ao OELS (Veras et al., 2013b), foi realizado um estudo com diferentes doses de timol para avaliar se na faixa de dosagem próxima a avaliada nas NCLS e OELS, qual seria o comportamento do timol sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.

O tratamento tópico dos animais com concentrações crescentes de timol (0,03 – 0,6 mg/orelha) permitiu mostrar que este terpeno causa um efeito pro- e anti-edematogênico (Figura 29). Os resultados obtidos formam visivelmente uma curva normal, onde o timol na menor dose reduziu significativamente o edema de orelha ($0,01 \pm 0,006$ mm) em relação ao grupo veículo/controle ($0,04 \pm 0,005$ mm), mas nas doses de 0,1 não interferiu significativamente no edema ($0,03 \pm 0,006$ mm), e na dose de 0,3 mg/orelha, aumentou significativamente o edema ($0,06 \pm 0,003$ mm). O timol na maior dose, por sua vez (0,6 mg/orelha), voltou a reduzir o edema ($0,03 \pm 0,008$ mm) em relação ao grupo veículo/controle.

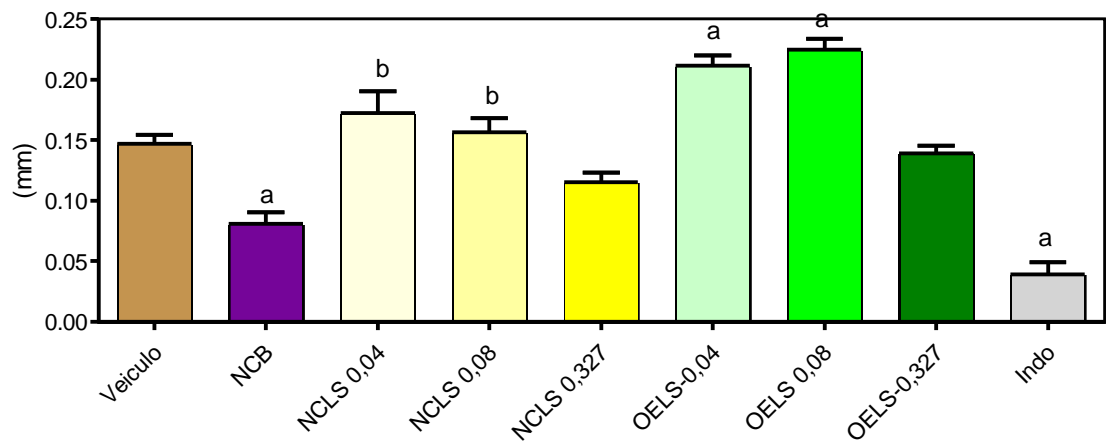
Comparando os resultados obtidos com as diferentes doses de timol (figura 29) aos obtidos com as NCLS e OELS (figura 27), podemos observar que o timol na dose de 0,03 mg/orelha apresentou efeito anti-edematogênico, enquanto o OELS (0,04 mg/orelha) com concentrações de timol próximas a esta (timol: 0,024 mg/orelha), apresentaram efeito pró-edematogênico. Isto nos leva a inferir que outros componentes presentes no OELS, ao lado do timol possuem um papel importante, e estão possivelmente contribuindo para a não relação direta dose-resposta entre os tratamentos dos animais com timol ou OELS. O que foi observado para o timol versus OELS, aplica-se também para as NCLS (0,04 mg de

OELS/orelha). O OELS objeto deste estudo possui como constituintes majoritários, o timol -65%, o-cimeno- 17% e e-cariofileno - 4%, além de outros constituintes em pequenas quantidades.

Em trabalho desenvolvido por Oliveira (2009) foi verificado que a aplicação tópica do OELS (constituintes majoritários: timol - 70%, cariofileno - 8% e p-cimeno - 7%) em orelha de camundongo promoveu efeito pro-edematogênico comparável ao xileno. Em outro estudo (Oliveira, et al., 2014) a avaliação dos efeitos da aplicação tópica do OELS em pele intacta e lesionada demonstrou que o óleo em doses altas (25,5 e 100%), principalmente quando utilizado in natura apresentou efeitos irritante a pele de ratos, caracterizado por aumento da espessura da epiderme, eritema, edema, infiltração de polimorfonucleares, e perda da elasticidade e hidratação da pele. Em baixas doses (6 e 12%) apresentou discreto eritema e edema, o que sugere que o potencial irritante do OELS é dose dependente.

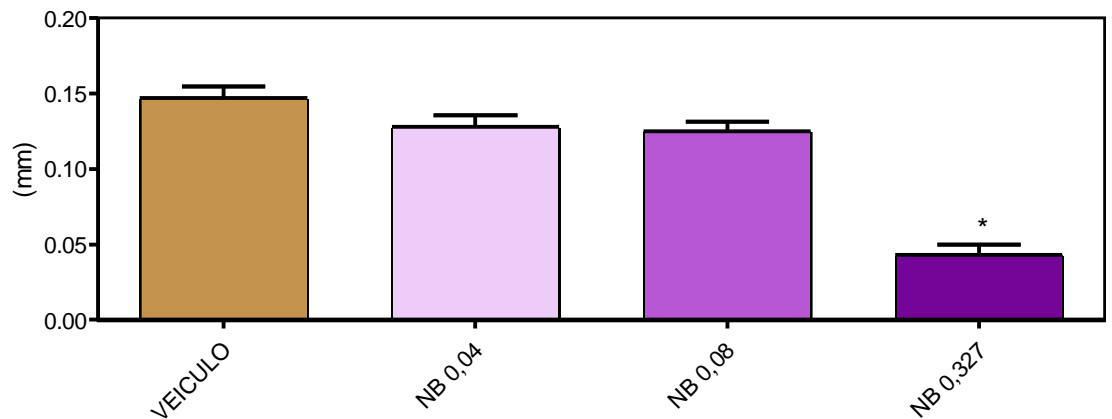
Monteiro et al (2007), avaliando o efeito anti-inflamatório agudo em modelo de edema de orelha induzido por TPA (camundongos fêmea), demonstrou que o OELS (timol- 66%, p-cimeno - 7%, alfa terpineno - 4%), nas doses de 1 e 10 mg/orelha inibiu o edema em 46 e 35%, respectivamente. Veras et al. (2013b) verificou que a aplicação tópica de 2 mg/orelha de OELS e timol reduziu significativamente o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em 45,1%, e 47,4%, respectivamente; e o edema induzido por fenol em 32,2% ($p < 0.05$) e 37,4% ($p < 0.01$), respectivamente. Não houve diferenças significativas entre a atividade anti-edematogênica do OELS ou do timol. Por outro lado, o tratamento tópico crônico com OELS ou timol mostrou efeito inflamatório em camundongos. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo são corroborados pela literatura, que comprova que existe uma faixa de concentração em que o OELS apresenta ação anti-inflamatória, e outra em que apresenta ação pro-inflamatória. No presente estudo os resultados obtidos com o timol, um dos princípios ativos das NCLS e OELS, mostraram isso com maior clareza.

Figura 27 - Efeito das NCLS e OELS no edema de orelha induzido por TPA em camundongo



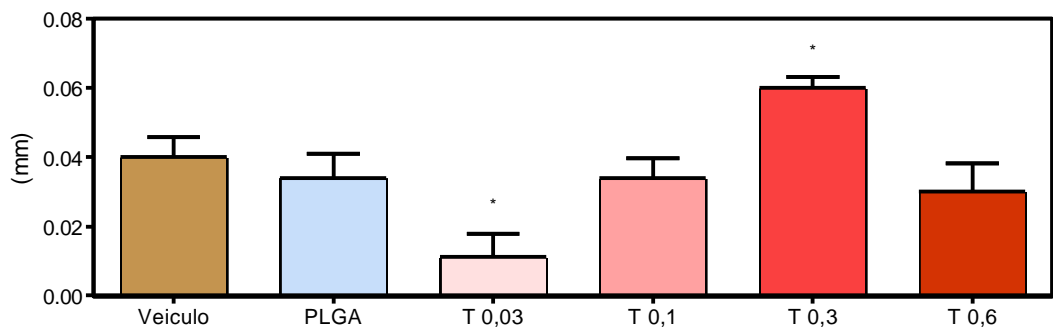
Os animais foram tratados por via tópica com concentrações (mg/orelha) crescentes de NCLS, OELS, indometacina (Indo), NCB (sem OELS) ou veículo (acetona) 10 minutos antes da administração de TPA (2,5 μ L). Resultados representam a média \pm EPM do edema de orelha registrado 4h após aplicação TPA. Foram utilizados grupos de 6 – 7 animais. a vs veículo e b vs NCB ($p < 0,05$, ANOVA e teste Tukey).

Figura 28 - Efeito das Nanocápsulas Brancas (NCB) sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.



Os animais foram tratados por via tópica com concentrações (mg/orelha) crescentes de NCB (nanocápsula sem OELS) ou veículo (acetona) 10 minutos antes da administração de TPA (2,5µL). Resultados representam a média ± EPM do edema de orelha registrado 4h após aplicação TPA. Foram utilizados grupos de 6 animais. *= p<0,05 (ANOVA e teste Tukey).

Figura 29 - Efeito do PLGA e do timol sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.



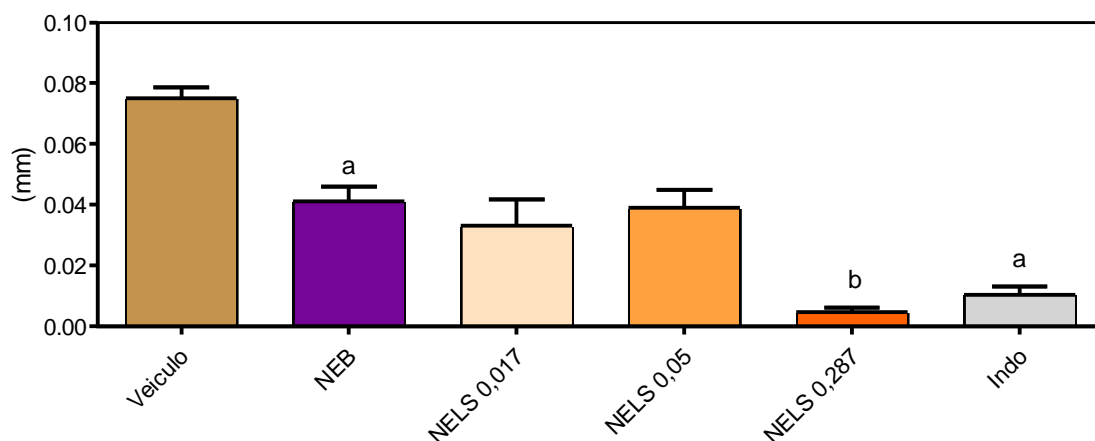
Os animais foram tratados por via tópica com PLGA (0,036 mg/orelha), timol (0,03; 0,1; 0,3 e 0,6 mg/orelha) ou veículo (acetona) 10 minutos antes da administração de TPA (2,5 µL). Resultados representam a média ± EPM do edema de orelha registrado 4h após aplicação TPA. Foram utilizados grupos de 6 animais. *= p<0,05 (ANOVA e teste Tukey).

Em virtude das NCB terem apresentado ação antiedematogênica e qualquer aumento da dosagem de NCLS implicar em aumento dos excipientes e desta forma interferir no estudo, e tendo em vista o histórico do PLGA em apresentar ação anti-inflamatória quando em estrutura nano, foi proposto um outro ensaio

excluindo o PLGA da formulação. Ou seja, um ensaio utilizando o OELS encapsulado em forma de nanoemulsão (NELS). Nesse estudo (Figura 30), a nanoemulsão branca (NEB), da mesma maneira que as NCB, demonstrou efeito anti-edematogênico significativo (NEB: $0,04 \pm 0,004$ mm) em relação ao veículo ($0,07 \pm 0,003$ mm). Portanto, diferente do que se havia pensado, o PLGA parece não ter um papel importante no efeito antiedematogênico observado no nanosistema sem o OELS. Este efeito, está possivelmente relacionado a presença do poloxamer, fosfatidilcolina ou a associação de ambos no nanosistema.

A figura 30 mostra também o efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *Lippia sidoides* – NELS (0,017; 0,05 e 0,3 mg/orelha) sobre o edema de orelha induzido por TPA. A NELS administradas por via tópica na maior dose reduziu significativamente ($0,005 \pm 0,001$ mm) o edema de orelha induzido por TPA em relação ao grupo NEB ($0,04 \pm 0,004$ mm), correspondendo a uma inibição de 87,5 %. A indometacina (0,08 mg/orelha), fármaco padrão, inibiu o edema em 75 %. É importante salientar que as formulações NEB e NELS 0,3 mg/orelha em termos de concentração de componentes, diferem apenas pelo fato de que na NEB o OELS está ausente. Portanto, mesmo que haja interferência dos excipientes do nanosistema, o efeito antiedematogênico apresentado pela NELS 0,3 mg/orelha foi significativamente superior, comprovando desta maneira que a ação apresentada se deve a presença do OELS no nanosistema. Desta forma pode-se inferir que a veiculação do OELS em nanosistema constituído de nanoemulsão, apresenta melhor eficácia em termos de ação antiedematogênica em relação às nanocápsulas.

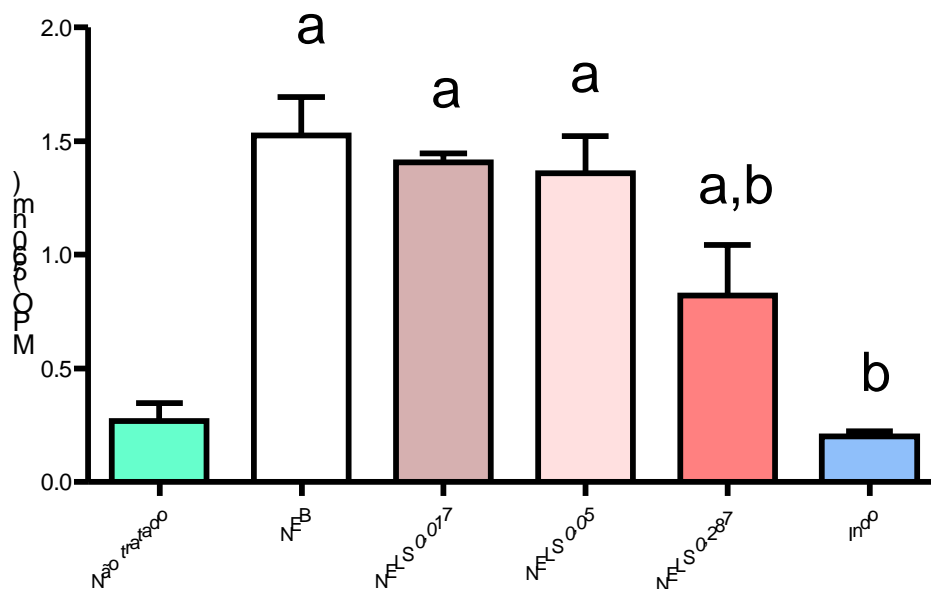
Figura 30 - Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *Lippia sidoides* (NELS) sobre o edema de orelha induzido por TPA em camundongos.



Os animais foram tratados por via tópica com concentrações (mg/orelha) crescentes de NELS, NEB (nanocápsula sem OELS), indometacina (Indo, 0,08 mg/orelha) ou veículo (acetona) 10 minutos antes da administração de TPA (2,5 μ L). Resultados representam a média \pm EPM do edema de orelha registrado 4h após aplicação TPA. Foram utilizados grupos de 6 animais. a vs veículo e b vs NEB ($p < 0,05$, ANOVA e teste Tukey).

A figura 31 mostra o efeito da NELS sobre o aumento da concentração de mieloperoxidase (MPO) induzida por TPA em orelha de camundongo. A administração tópica do TPA aumentou em cerca de 5,8 vezes a concentração de MPO (NEB/grupo controle: $1,53 \pm 0,16$) em relação ao grupo não tratado (sem TPA, $0,26 \pm 0,08$). Porém, o pré-tratamento dos animais com NELS (0,3 mg/orelha) reduziu significativamente esse aumento na concentração de MPO ($0,82 \pm 0,22$) em relação ao grupo NEB, correspondendo a uma inibição de 46,4 % da resposta. A indometacina (fármaco padrão) reduziu em 87 % a concentração de MPO no homogenato da orelha de camundongos tratados com TPA.

Figura 31 - Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *L. sidoides* (NELS) sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase induzida por TPA em orelha de camundongo.



Os animais foram tratados por via tópica com concentrações (mg/orelha) crescentes de NELS, NEB (nanocápsula sem OELS), indometacina (Indo, 0,08 mg/orelha) ou veículo (acetona) 10 minutos antes da administração de TPA (2,5 μ L). Resultados representam a média \pm EPM do edema de orelha registrado 4h após aplicação TPA. Foram utilizados grupos de 6 animais. a vs não tratado e b vs NEB ($p < 0,05$, ANOVA e teste Tukey).

A inflamação possui um papel fundamental na instalação e no progresso de várias doenças da pele, como a psoríase e a dermatite. Esta última, ainda constitui um desafio para a medicina, quanto ao seu tratamento, que inclui especialmente o emprego de anti-inflamatórios, tais como os corticóides e imunomoduladores (Rance 2005; Kobata, 2010). Porém, devido a pouca efetividade dessas terapias, por vezes observada, e a ocorrência de efeito colaterais importantes, tem-se observado a necessidade de investir na pesquisa de novos fármacos úteis no tratamento dessas enfermidades. Nesse contexto, modelos experimentais que procuram mimetizar patologias que ocorrem em humano têm um papel importante nesse processo, embora apresentem limitações. Nesse contexto, um dos modelos empregados na pesquisa de fármacos com potencial anti-inflamatório para o tratamento de doenças inflamatórias da pele, tem sido o modelo

de dermatite induzida por TPA (13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol) (Puignero; Queralt, 1997).

O edema de orelha induzido por TPA em roedor tem sido largamente empregado na pesquisa de fármacos anti-inflamatórios, e um aspecto importante a esse respeito, constitui a existência de uma boa descrição sobre os mecanismos envolvidos na indução da inflamação aguda induzida pelo TPA, mostrando respostas similares ou próximas àquela observada na dermatite de contato irritativa. Nesse modelo, o edema apresenta uma intensa celularidade, predominantemente polimorfonucleares (PMN), ativação de enzimas como ciclooxigenase e lipoxigenase, além de quinases (proteína quinase C) e proteases, como a mieloperoxidase. Isso, além da liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Wang et al., 2001; Murakawa et al., 2006). No presente estudo, a NELS reduziu o edema de orelha induzido por TPA em camundongos, possivelmente por modular o acúmulo de células inflamatórias (PMNs) no foco inflamatório, em especial neutrófilos, principal fonte de mieloperoxidase no organismo animal.

A MPO é uma das principais enzimas liberadas dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos quando ativados. É uma heme proteína abundantemente expressa nos PMNs e corresponde a um pouco mais de 5% do total de proteínas da célula (Klebanoff, 1999). A MPO tem sido considerada por longo tempo uma constituinte chave do arsenal citotóxico neutrofílico por catalisar a formação de ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante que exibe atividade bactericida *in vitro* (Midwinter et al., 2001). Entretanto, observações recentes têm expandido essa visão e mostram que substâncias oxidantes derivadas do sistema MPO-H₂O₂ estão criticamente envolvidas na modulação de vias de sinalização, por exemplo, ativação de MAPK (Midwinter et al., 2001), indução de translocação de fatores de transcrição, como NF- κ B (Schoonbroodt et al., 1997), regulação de crescimento celular pela ativação de proteínas tumorais (Vile et al., 1998) e modulação na atividade de metaloproteinases (Fu et al., 2004).

Nesse contexto, foi investigado, então, quais os efeitos do OELS e do timol sobre os mecanismos pró-inflamatórios de neutrófilos humano, relacionados a produção de espécies reativas de oxigênio.

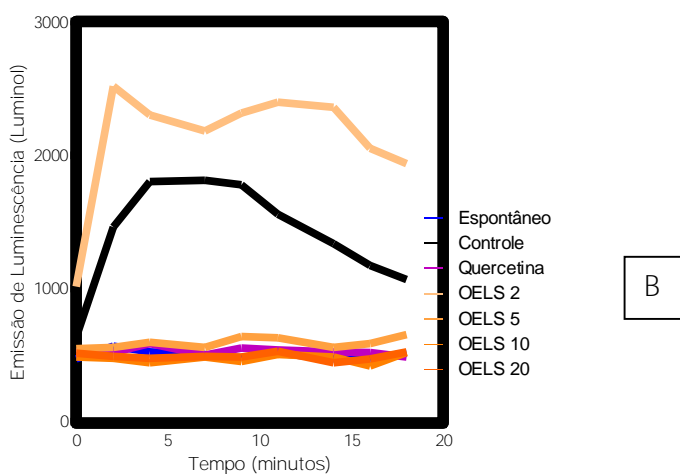
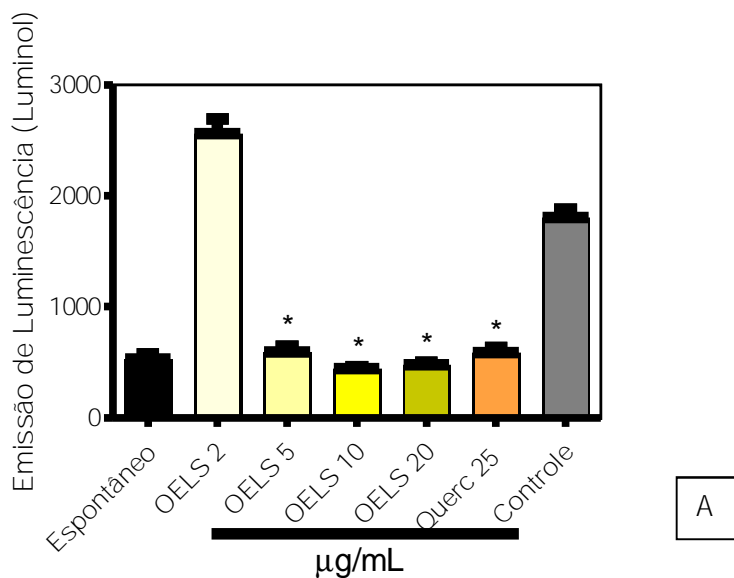
5.9 Avaliação dos efeitos do OELS e do timol, sobre o metabolismo oxidativo induzido por PMA em neutrófilos, empregando a técnica de quimioluminescência

A Quimioluminescência é um método que permite estudar a produção de EROs em tempo real, por neutrófilos ativados com auxílio de sondas, o luminol e a lucigenina (Kopprasch, Pietzsch, Graessler, 2003).

5.9.1 Quimioluminescência dependente de luminol

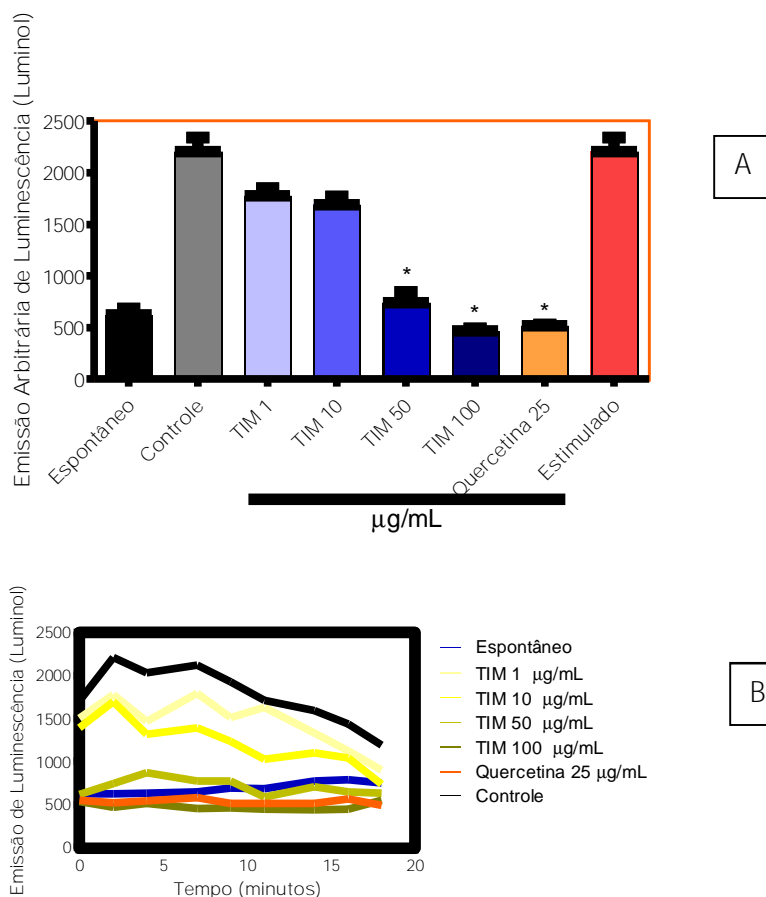
Para avaliar o efeito do OELS e do TIM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos ativados por PMA foi realizado ensaio de quimioluminescência utilizando como sonda, inicialmente o luminol (QL lum). O OELS (2, 5, 10 e 20 µg/mL) promoveu uma inibição significativa da produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) a partir da concentração de 5 µg/mL com reduções de até 75 % ($42,05 \pm 7,2$; $66,93 \pm 2,3$; $75,37 \pm 1,0$ e $73,41 \pm 1,3$ %, respectivamente) (figuras 32 A, B). Resultados semelhantes foram observados para o TIM, que reduziu em até 78 % a emissão da produção de QL lum, enquanto a quercetina – droga padrão reduziu a QL lum em $72,09 \pm 2,14$ % (Figura 33).

Figura 32 - Perfil de quimioluminescência de OELS dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).



Neutrófilos (5×10^6) foram incubados com OELS (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA ($0,1 \mu\text{mol/mL}$). Espontâneo: células não estimuladas; controle: DMSO – Veículo; Quercetina: droga padrão antioxidante. Os resultados estão expressos como media \pm EPM. * vc controle ($p < 0,05$ - ANOVA e teste de Turkey).

Figura 33 - Perfil de quimioluminescência de TIM dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).

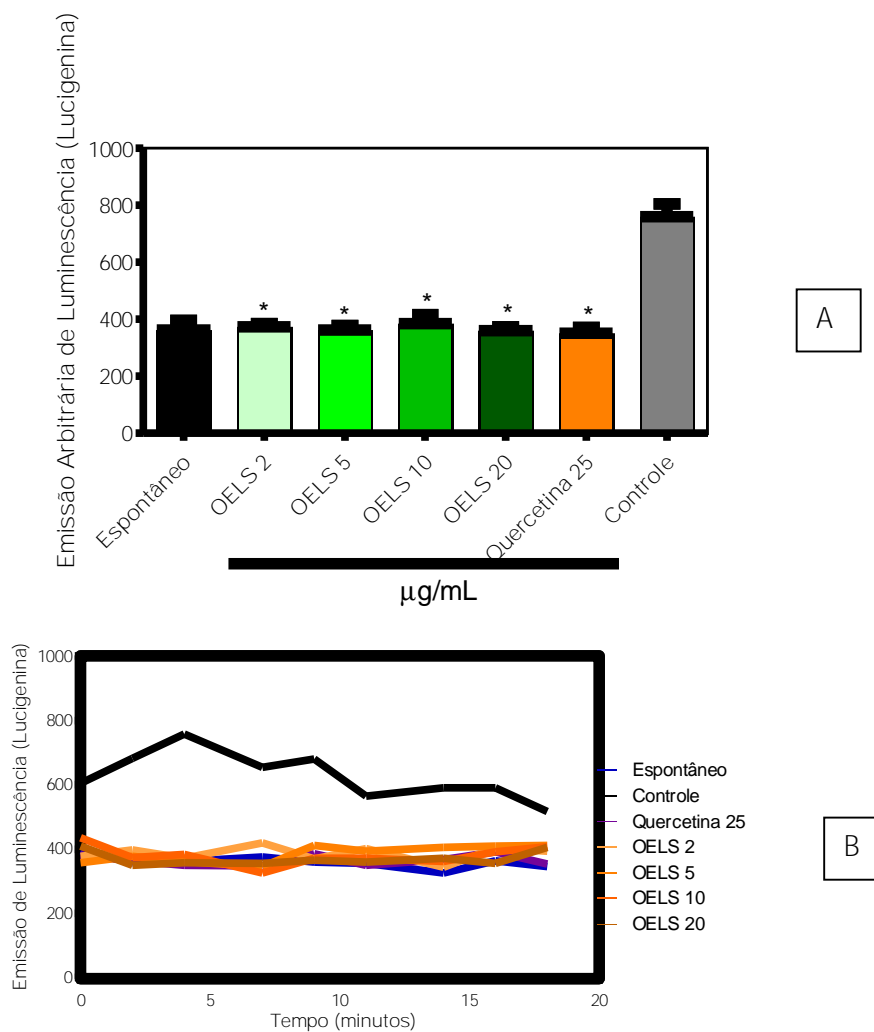


Neutrófilos (5×10^6) foram incubados com TIM (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{g/mol/L}$) espontâneo: células não estimuladas; Controle: DMSO-Veículo; Quercetina: droga padrão antioxidante. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e teste de Turkey).

5.9.2 Quimioluminescência dependente de lucigenina

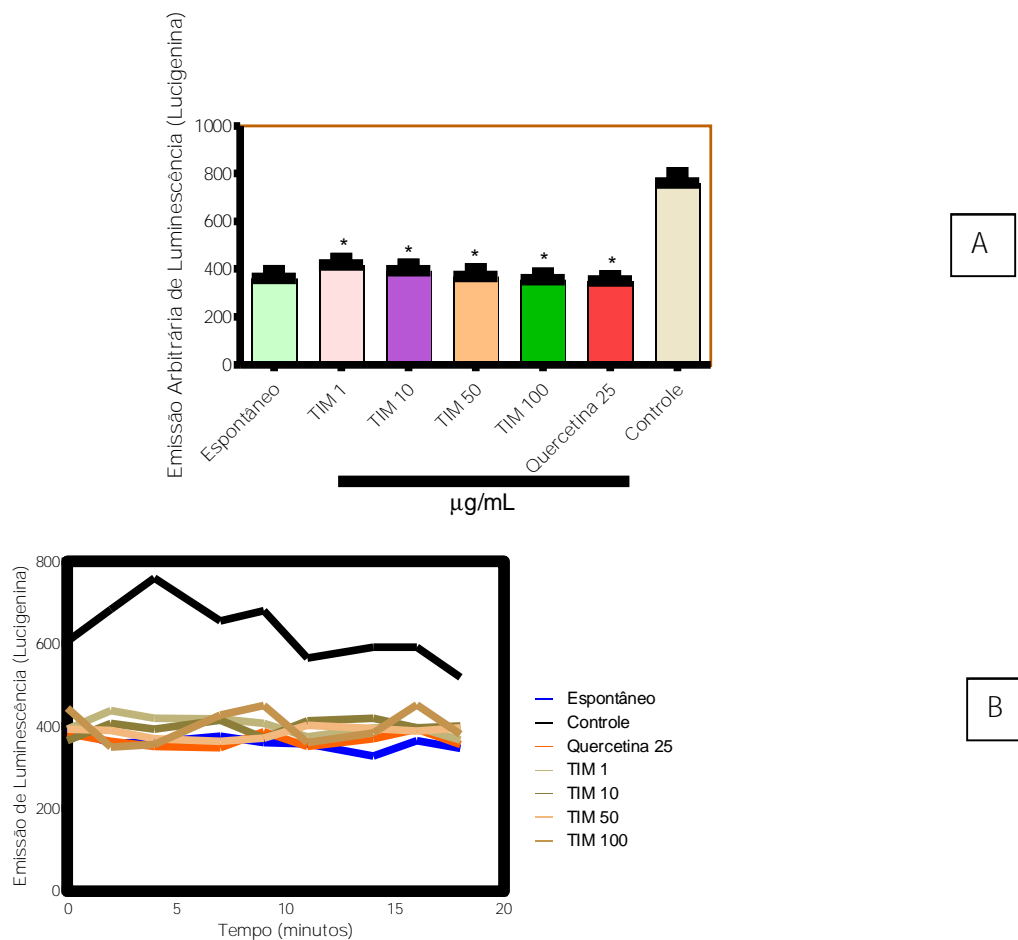
O OELS (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) promoveu inibição da quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc) em até 51% ($50,96 \pm 1,4$; $50,90 \pm 1,9$; $52,61 \pm 1,1$ e $51,71 \pm 1,8\%$, conforme pode ser verificado na Figuras 34 A e B. O TIM (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), por sua vez, à semelhança da quercetina (padrão), também reduziu a QL luc em até 53% ($44,90 \pm 3,6$; $48,26 \pm 3,6$; $51,42 \pm 4,2$ e $53,24 \pm 3,6\%$) (Figuras 35 A e B)).

Figura 34 - Perfil de quimioluminescência do OELS dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos)



Neutrófilos (5×10^6) foram incubados com OELS (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA ($0,1 \mu\text{mol/L}$). Espontâneo: células não estimuladas; Controle: DMSO – veiculo; Quercetina: padrão antioxidante. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 35 - Perfil de quimioluminescência de TIM dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em emissão arbitrária de luminescência em função do tempo (20 minutos).



Neutrófilos (5×10^6) foram incubados com TIM (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Espontâneo: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo; Quercetina: droga padrão antioxidante. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Importante destacar que o efeito antioxidante do OELS e do timol não está relacionada a uma possível citotoxicidade em neutrófilo humano, considerando que esse efeito foi observado também em concentrações que esses produtos não mostraram toxicidade determinada através da atividade da LDH e teste MTT.

Diante dos resultados obtidos, para avaliar se ação antioxidante apresentada pelo OELS estaria relacionada a uma possível ação sequestradora de radical livre, foi então investigado o efeito do OELS sobre o radical DPPH.

5.10 Avaliação da atividade antioxidante/sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das NCLS e OELS

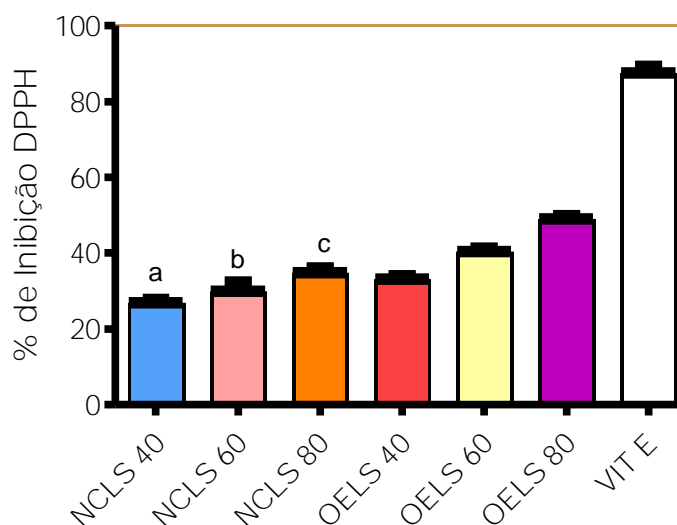
Dentre os modelos experimentais que podem ser empregados na prospecção de produtos antioxidantes o teste que avalia a redução do radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), é uma técnica simples, rápida e que independe de qualquer atividade enzimática (Oliveira et al, 2015).

Para realização deste estudo o OELS foi diluído em etanol absoluto para atingir a mesma concentração das NCLS, em relação ao marcador timol, e desta forma avaliar o efeito da encapsulação do óleo sobre a atividade sequestradora do radical livre DPPH.

Na figura 36 pode ser observado efeito do OELS e das NCLS sobre o radical DPPH. A adição de concentrações crescentes da diluição do OELS (40, 60 e 80 µg/mL), reduziu o radical DPPH em até 49% (33, 40 e 49% de inibição do radical DPPH respectivamente). Este efeito foi também observado quando o OELS foi encapsulado (NCLS: 40, 60 e 80 µg/mL), com redução de 27, 30 e 35%, respectivamente. Enquanto que a vitamina E (50 µg/mL), substância padrão para atividade antioxidante, reduziu em 85,5% o radical DPPH.

A comparação entre os resultados da porcentagem de inibição do radical DPPH, para as mesmas diluições do OELS e das NCLS mostrou que há diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$), nas três diluições avaliadas. Isto significa que a nanoencapsulação do OELS na formulação proposta neste estudo, interfere na capacidade do OELS em sequestrar o radical livre DPPH. Portanto as diferenças encontradas no valor da porcentagem de inibição do radical livre DPPH entre o OELS e as NCLS podem ser decorrentes do curto período de reação do ensaio não favorecer uma liberação satisfatória do ativo a partir das NCLS.

Figura 36 – Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS) e nanocápsulas contendo OELS (NCLS) sobre a redução do radical DPPH.



As concentrações avaliadas foram (40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$) calculadas em óleo essencial. Vitamina E (50 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como padrão de atividade antioxidante. Resultados representam a média \pm EPM de três determinações. a vs OELS 40, b vs OELS 60, c vs OELS80.NEB ($p < 0,05$, ANOVA e teste Tukey).

Considerações finais sobre os ensaios biológicos

Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos são componentes chave na resposta inflamatória aguda, e mais recentemente foi comprovada sua importância em doenças inflamatórias crônicas (Di Stasi & Ley, 2009; Huang et al., 2015). Essas células representam uma das principais fontes de oxidantes que contribuem para danos em doenças cardíacas, cérebro-vasculares, metabólicas e pulmonares (Xie *et al.*, 2010; Abdel-Latif *et al.*, 2008; Baetta & Corsini. Atherosclerosis, 2009).

No presente estudo tanto o OELS quanto o timol foram capazes de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos induzidos por PMA, um potente ativador celular receptor-independente que estimula diretamente a proteína quinase C (PKC). No neutrófilo a ativação da PKC resulta na ativação do sistema enzimático NADPH oxidase, que desencadeia a produção de oxidantes na célula; ademais são ativadas também várias proteínas quinases ativadas por

mitogénos (MAPKs) como a ERK, envolvidas em mecanismos de transdução que culminam na transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas (SHEPPARD *et al.*, 2005; ZU *et al.*, 1998; Serhan *et al.*, 2008).

Verificou-se que OELS e o timol reduziram significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) mensuradas tanto pelo QL lum quanto QL luc. O luminol, devido ao seu baixo peso molecular e lipofilicidade, possui a capacidade de se difundir através das membranas biológicas, permitindo a detecção de EROS intra e extracelular, embora haja uma maior sensibilidade para aquelas envolvidas no sistema MPO-H₂O₂ (Dahlgren E Stendahl, 1983; Aniansson *et al.*, 1984; O'dowd *et al.*, 2004). A lucigenina, por sua vez, mede especificamente o primeiro radical livre gerado durante o *burst* respiratório, o ânion superóxido.

Dessa forma, o OELS e o timol ao inibir parcialmente as duas vias de sinalização relacionadas a produção de oxidantes por neutrófilo, comprovam que são capazes de inibir tanto a produção do ânion superóxido, como a de outras EROS que envolve a participação da MPO. Ademais, parte da redução da produção de EROS do OELS pode estar relacionado a uma ação sequestradora de radical livre (teste DPPH). Esses resultados corroboram com o efeito anti-edematogênico da NELS *in vivo* determinado no presente estudo, e descrevem um mecanismo de ação anti-inflamatório para *Lippia sidoides* em neutrófilo humano ainda não descrito na literatura.

Todavia, embora tenha apresentado atividade anti-inflamatória em neutrófilos humanos, a ação não seletiva do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS) pode causar danos nas células hospedeiras. Conseqüentemente, o seu uso inadequado pode causar danos à pele e agravar ou interferir na restauração da barreira cutânea. Recentemente, Oliveira e colaboradores (2014) investigaram os efeitos da administração contínua do OELS na pele íntegra ou agravada por outros agentes irritantes, no intuito de avaliar a segurança do OELS. Neste estudo eles encontraram que o OELS em altas concentrações produz efeitos irritantes na pele de camundongos, demonstrado através do aumento do edema, espessura da pele e formação de eritema. Assim, o emprego do OE de *L. sidoides* em nanosistemas pode constituir uma estratégia relevante para usufruir do potencial farmacológico desse produto de maneira mais segura, com redução da toxicidade.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A droga vegetal constituída de folhas de *L. sidoides* foi caracterizada, quanto ao teor de cinzas, cinzas insolúveis em ácido, teor de óleo essencial, e teor de extrativos em etanol, estabelecendo desta forma parâmetros para nortear o controle de qualidade desta espécie.
- O óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas de *L. sidoides* (OELS) foi caracterizado por CG-EM, e padronizado quanto ao teor do marcador timol por CLAE-DAD.
- O método analítico para doseamento de timol em OELS e em NCLS por CLAE-DAD se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto.
- As nanocápsulas (NCLS) preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e constituídas de PLGA, fosfatidilcolina e poloxamer 407, contendo OELS (7,5 mg/mL) demonstraram ser viáveis em relação ao tamanho de partícula (190 nm), potencial zeta (-23 mV), e PDI (0,2), com alto rendimento de processo (79,3%), e eficiência de encapsulação do ativo (92%).
- A análise morfológica das NCLS realizada por microscopia de força atômica (AFM) revelou que as partículas são perfeitamente esféricas, com ausência de rugosidades, sendo possível identificar a estrutura de um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica.
- A análise por DSC demonstrou que o OELS interage com os constituintes da formulação (PLGA, poloxamer, fosfatidilcolina), e esta interação favorece a estabilidade térmica do sistema.
- A espectroscopia micro-Raman mostrou-se uma técnica rápida, prática e eficaz para caracterização dos nanosistemas contendo OELS desenvolvidos nesta pesquisa. E embora não seja eficaz na distinção entre nanocápsulas e

nanoemulsão carregadas com o ativo OELS, pode ser considerada uma importante ferramenta na análise qualitativa desses nanosistemas.

- A nanoencapsulação do OELS em nanocápsulas poliméricas não comprometeu sua atividade de inibição do crescimento microbiano (*S. aureus*), porém foi necessário o dobro da dose de NCLS, em relação ao OELS livre para causar letalidade à bactéria.
- A nanoencapsulação do OELS preveniu a citotoxicidade em neutrófilo humano mensurada através dos testes de MTT e LDH.
- A avaliação da atividade anti-inflamatória tópica em camundongos, demonstrou que o óleo essencial e o timol dependendo da dose possui atividade pró ou anti-inflamatória.
- O nanosistema sem ativo mostrou efeito antiedematogênico, e dentre os nanosistemas investigados, NCLS e NELS, o último inibiu significativamente o edema de orelha induzido por TPA e reduziu a concentração de mieloperoxidase (MPO). Parte desse efeito está também relacionado à redução da produção de oxidantes induzida por PMA em neutrófilo, incluindo ânion superóxido e EROS - MPO-H₂O₂.
- O desenvolvimento e a padronização do nanosistema a base de *L. sidoides* mostrou características tecnológicas de interesse, extinguiu a toxicidade do OELS em neutrófilo humano mantendo o potencial antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório do OELS.

Referências

7. REFERENCIAS

ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial; Panorama nanotecnologia, Série Cadernos da Indústria ABDI Volume XIX. 180p. Brasília: ABDI, 2010. disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20de%20Nanotecnologia.pdf> acesso em 21 de fevereiro de 2016.

EDITION, Approved Standard-Tenth. CLSI document M02-A10. 2009.

ABREU, F.O.M.S.; OLIVEIRA, E.F; PAULA, H.C.B.; DE PAULA, R.C.M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation, Carbohydrate Polymers, Volume 89, Issue 4, 1, Pages 1277-1282,2012.

AGUIAR, M. L. B. A.; MATOS, F. J. A.; MOURA, V. R. A atividade antibiótica de plantas da flora nordestina. Ciência e Cultura, v. 36, n. 7 Suplemento 547, 1984.

ALENCAR, L.M.R. Estudo da Viscoelasticidade de Células de Câncer Renal por Microscopia de Força Atômica (tese) Doutorado em Física, Universidade federal do Ceara, Fortaleza-CE, 2010.

ALLÉMANN, E., LEROUX, J. C., GURNY, R., DOELKER, E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly (DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. Pharmaceutical research, 10(12), 1732-1737, 1993.

ALMEIDA, M. R., FIDELIS, C. H., BARATA, L. E., & POPPI, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. Talanta, 117, 305-311, 2013.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M. V., & AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova, 33(10), 2202-2210, 2010.

ALVES, P. B.; EVANGELINO, T. S.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, I. N. & DA CAMARA, C. A. G. Composição química de acessos de *Lippia sidoides* do banco de germoplasma da UFS, IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Fortaleza, 2007. Disponível em:http://www.ivsboe.padetec.ufc.br/CDSimposio/quimicaeatividadesbiologicasdosoleosessenciais/Resumo_AlvesPB1.pdf

ALVES, P.B.; EVANGELINO, T.S.; BLANK, A.F, SANTOS, R.B.; FREITAS, F.P.; MATOS, H.R. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. IN: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

ANDRIEUX, K., & COUVREUR, P. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(5), 463-474, 2009.

ANSARI, S. H., ISLAM, F., & SAMEEM, M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 3(3), 142, 2012.

ARARUNA, SANDRA M ; ALINE HOLANDA SILVA ; CANUTO, KIRLEY MARQUES ; SILVEIRA, EDILBERTO R ; LEAL, L.K.A.M. . Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, v. 23, p. 132-137, 2013.

ARAÚJO LOPES, A., MAGALHÃES, T. R., ANDRADE UCHÔA, D. E., SILVEIRA, E. R., AZZOLINI, A. E., KABEYA, L. M., ... & LEAL, L. K. (2013). Afrormosin, an isoflavonoid from *Amburana cearensis* AC Smith, modulates the inflammatory response of stimulated human neutrophils. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 113(6), 363-369.

ATTWOOD, DAVID; FLORENCE, A. T. Princípios físico-químicos em farmácia. Pharmabooks, 2003.

BABIOR, B. M., LAMBETH, J. D., & NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 397(2), 342-344, 2002.

BAKSHI, H., SHOKUH FAR, A., & AFGHAHI, S. S. S. Structural, magnetic and Raman study of CoFe₂O₄@C core-shell nanoparticles. *Ceramics International*, 41(9), 10736-10744, 2015.

BAKKALI, F., ET AL. . Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp.446-475, 2008. [Em linha]. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>> [Consultado em 02-11-2013].

BARON, E. J., & FINEGOLD, S. M. Methods for testing antimicrobial effectiveness, Baily & Scotts diagnostic microbiology. *New York: Mosby, 1994*

BASAK, R., & BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in Pluronic F127 micelles: effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. *Langmuir*, 29(13), 4350-4356, 2013.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Nanocosmetics and Nanomedicines. *New Approaches for Skin Care*, 2011.

BENDER, E. A., ADORNE, M. D., COLOMÉ, L. M., ABDALLA, D. S., GUTERRES, S. S., & POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly (ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International journal of pharmaceutics*, 426(1), 271-279, 2012.

BERNAL C, COUTO AB, BREVIGLIERI ST, CAVALHEIRO ETG. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Quím Nova*; 25(5):849-55, 2002.

BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. D. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. D., CUNHA, F. A., & CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, 17(3-4), 80-83, 2005.

BESHEER, A., VOGEL, J., GLANZ, D., KRESSLER, J., GROTH, T., & MÄDER, K. Characterization of PLGA nanospheres stabilized with amphiphilic polymers: hydrophobically modified hydroxyethyl starch vs pluronics. *Molecular pharmaceutics*, 6(2), 407-415, 2009.

BONACUCINA, G., CESPI, M., MENCARELLI, G., GIORGIONI, G., & PALMIERI, G. F. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers*, 3(2), 779-811, 2011.

BOODHWANI, M., FENG, J., MIENO, S., RAMLAWI, B., SODHA, N., CLEMENTS, R., & SELLKE, F. W. (2006). Effects of purified poloxamer 407 gel on vascular occlusion and the coronary endothelium. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 29(5), 736-741.

BORGES, A. R., DE ALBUQUERQUE AIRES, J. R., HIGINO, T. M. M., DE MEDEIROS, M. D. G. F., CITÓ, A. M. D. G. L., LOPES, J. A. D., & DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. (2012). Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental parasitology*, 132(2), 123-128, 2012.

BORGES, L. L., LÚCIO, T. C., GIL, E. D. S., & BARBOSA, E. F. (2011). Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer de Goiânia*, 7, 12, 2011.

BOTELHO, M. A., BARROS, G., QUEIROZ, D. B., CARVALHO, C. F., GOUVEA, J., PATRUS, L., REGO, A.; SILVA, I.; CAMPUS, G. , ARAUJO-FILHO, I. Nanotechnology in Phytotherapy: Antiinflammatory Effect of a Nanostructured Thymol Gel from *Lippia sidoides* in Acute Periodontitis in Rats. *Phytotherapy Research*, 30(1), 152-159, 2016.

BOTELHO, M. A., DOS SANTOS, R. A., MARTINS, J. G., CARVALHO, C. O., PAZ, M. C., AZENHA, C., RUELA, F. I. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. *Phytotherapy Research*, 23(9), 1214-1219, 2009.

BOTELHO, M.A., NOGUEIRA, N.A., BASTOS, G.M., FONSECA, S.G., LEMOS, T.L., MATOS, F.J., MONTENEGRO, D., HEUKELBACH, J., RAO, V.S., BRITO, G.A.,. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 349–356, 2007.

BOTELHO, M. A.; RUELA, R. S.; MONTENEGRO, D.; COSTA, J. G. M.; SANTOS, J. A.; FRANÇA, M. C Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical Biology Research On Line*, v.40, n.3, p.349-356, 2007b.

BOUWMEESTER, H., DEKKERS, S., NOORDAM, M. Y., HAGENS, W. I., BULDER, A. S., DE HEER, C., ... & SIPS, A. J. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 53(1), 52-62, 2009.

BRANQUINHO, R. T., MOSQUEIRA, V. C. F., KANO, E. K., DE SOUZA, J., DORIM, D. D. R., & DE LANA, M. HPLC–DAD and UV–Spectrophotometry for the Determination of Lychnopholide in Nanocapsule Dosage Form: Validation and Application to Release Kinetic Study. *Journal of chromatographic science*, 52(1), 19-26, 2014.

BRASIL, 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] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa, 2011. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 out. 2012.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira . 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 524 p., 1v/il. (a)

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 808 p., 1v/il. (b)

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 808 p., 1v/il. (b)

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 2003.

BULCÃO, R. P., DE FREITAS, F. A., DALLEGRAVE, E., VENTURINI, C. G., BAIERLE, M., DURGANTE, J., SALVADOR, M. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 167-177, 2014.

BURD, J. F.; USATEGUI-GOMEZ, M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta*, v. 46, n. 3, p. 223-227, 1973.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CANEVAROLO JR, Sebastião V. et al. Técnicas de caracterização de polímeros. *Artliber*, São Paulo, v. 430, n. 2004, 2004.

CARREÑO, F., PAESE, K., SILVA, C. D. M., GUTERRES, S. S., & COSTA, T. D. CHARACTERIZING THE MECHANISM OF QUETIAPINE DISTRIBUTION IN LIPID-CORE NANOCAPSULES PSEUDO-PHASES USING A VALIDATED LC/UV METHOD. *Química Nova*, 38(9), 1181-1186, 2015.

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.

CASTRO, C.E, RIBEIRO, J.M, DINIZ, T.T, ALMEIDA, A.C, FERREIRA, L.C, MARTINS, E.R, & DUARTE, E.R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 13(3), 293-297,2011.

CASTRO-COSTA, C.M.; SANTOS, T.J.T.; CASTRO-COSTA, S.B. Modelos animais e laboratoriais de dor. In: NETO, O. A. et al. Dor: Princípios e Práticas. Porto Alegre: Artmed, parte II-23, p. 305-312, 2009.

CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., ASTIER, A., & PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. International journal of pharmaceutics, 250(1), 273-281, 2003.

CAVALCANTI, S.C.H.; NICULAU, E.S; BLANK, A.F.; CÂMARA, C.A.G.; ARAÚJO, I.N.; ALVES, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Bioresource Technology, v. 101, p. 829–832, 2010.

CHAN, F. K. M., MORIWAKI, K., & DE ROSA, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*, 65-70.

CHEN D.; LEE, Y; YEH, P.; LIN, J.; CHEN, Y.; HUNG, S. Eugenol inhibited the antimicrobial functions of neutrophils. Basic research. v. 34, p. 176-180, 2008.

CHEREDDY, K. K., COCO, R., MEMVANGA, P. B., UCAKAR, B., DES RIEUX, A., VANDERMEULEN, G., & PRÉAT, V. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 208-215, 2013.

CHIANELLI, M.; MATHER, S. J.; MARTIN-COMIN, J.; SIGNORE, A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review. *Nucl. Med. Com.*, v.18, p. 437-455, 1997.

Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J., & Haroutounian, S. A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261-8267,2004.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Lipossomas em formulações dermocosméticas *Infarma*, v.16, nº 7-8, 2004.

CONTRI, R. V. (2010). Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação in vitro. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federam do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2010.

COSTA SÔNIA MARIA O., LEMOS TELMA LEDA G., PESSOA OTÍLIA DEUSDÊNIA L., ASSUNÇÃO JOÃO CARLOS C., BRAZ-FILHO RAIMUNDO. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 2002 [serial on the Internet]. [cited 2012 Feb 28]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2002000300032&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300032>.

COSTA, J. P. R., DE ALMEIDA, A. C., MARTINS, E. R., RODRIGUES, M. N., DOS SANTOS, C. A., & MENEZES, I. R. (2011). Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. *Biotemas*, 24(4), 1-6, 2011.

CZAMARA, K., MAJZNER, K., PACIA, M. Z., KOCHAN, K., KACZOR, A., & BARANSKA, M. (2015). Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1), 4-20.

DAFERERA, Dimitra J.; TARANTILIS, Petros A.; POLISSIOU, Moschos G. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 20, p. 5503-5507, 2002.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils, *J. Immunol. Meth.* 232, 3–14, 1999.

DALMOLIN, L. F., KHALIL, N. M., & MAINARDES, R. M. Delivery of Vanillin by Poly (Lactic-Acid) Nanoparticles: Development, Characterization and In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity. *Materials Science and Engineering: C*. 2016.

DAUDT, R. M., EMANUELLI, J., KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. *Ciência e Cultura*, 65(3), 28-31, 2013.

DE ALBUQUERQUE, U. P., DE MEDEIROS, P. M., DE ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., NETO, E. M. D. F. L., DE MELO, J. G., & DOS SANTOS, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*, 114(3), 325-354.

DE FÁTIMA GUILHERMINO, J., SIANI, A. C., QUENTAL, C., & BOMTEMPO, J. V. Desafios e Complexidade para Inovação a partir da Biodiversidade Brasileira. *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica*, 4(1), 2015.

DE OLIVEIRA, A. R.; MOLINA, E. F.; DE CASTRO MESQUITA, P.; FONSECA, J. L. C.; ROSSANEZI, G.; DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M., OLIVEIRA, A.G.; DA SILVA-JUNIOR, A.A. Structural and thermal properties of spray-dried methotrexate-loaded biodegradable microparticles. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 112(2), 555-565, 2013.

DEROCHETTE, S., FRANCK, T., MOUITHYS-MICKALAD, A., DEBY-DUPONT, G., NEVEN, P., & SERTEYN, D. (2013). Intra-and extracellular antioxidant capacities of

the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. *Chemico-biological interactions*, 201(1), 49-57, 2013.

DEVISSAGUET, J.P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F. Process for the preparaton of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules. *U.S. Patent No. 5,049,322*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Offic, 1991.

DIMER, F. A., FRIEDRICH, R. B., BECK, R. C. R., GUTERRES, S. S., & POHLMANN, A. R. (2013). Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978- Vol. 36, n. 10,(2013), p. 1520-1526.*

DISTASI, M. R., & LEY, K. (2009). Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends in immunology*, 30(11), 547-556, 2009.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 306–318.

DOS SANTOS, M. H., BATISTA, B. L., DA SDUARTE, S. M., DE ABREU, C. M. P., & GOUVÊA, C. M. C. P. (2007). Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, 30(3), 604,2007.

DURAN, N.; MORAIS, P. C.; MATTOSO, L. H. C, *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, São Paulo: Artliber, 2006. 208p.

ELOY, J. O. ;OLIVEIRA, E. C. V.; MAROTTA-OLIVEIRA, S. S.; SARAIVA, J.; MARCHETTI, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 35, n. 5, p. 1036-1040, 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500031&lng=en&nrm=iso>. access on 05 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000500031>.

ERBETTA, C.D. C.; VIEGAS, C.C. B.; FREITAS, R.F. S.; SOUSA, R.G. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). *Polímeros* [online]. 2011, vol.21, n.5 [cited 2016-05-06], pp.376-382. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282011000500007&lng=en&nrm=iso>. Epub Nov 23, 2011. ISSN 0104-1428. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-142820110005000063>.

ESFANDYARI-MANESH,M.; GHAEDI,Z.; ASEMI,M.; KHANAVI,M.; MANAYI,A.; JAMALIFAR,H.; ATYABI,F.; DINARVAND,R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles, *Journal of Pharmacy Research*, Volume 7, Issue 4, April 2013, Pages 290-295, ISSN 0974-6943, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.04.019>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0974694313001667>)

FABRI R L, NOGUEIRA M S, MOREIRA J R, BOUZADA M L, SCIO E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J Med Food*; 2011; 14 (7-8): 840-846.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 19, p. 59-65, 2004.

Farias EMFG, Ximenes RM, Magalhães LPM, Chiappeta ADA, De Sena KXDFR, De Albuquerque JFC. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. *J Herbal Med*. 2012; 2 (3): 63-7.

Farias MR 2003. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.) 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC.

Farias-Junior, P.A., Rios, M.C., Moura, T.A., Almeida, R.P., Alves, P.B., Blank, A.F., Fernandes, R.P.M., Scher, R., 2012. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biol. Res*. 45, 399–402.

FAROKHZAD, O. C., & LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano*, 3(1), 16-20, 2009.

FATTAHPOUR, S., SHAMANIAN, M., TAVAKOLI, N., FATHI, M., SHEYKHI, S. R., FATTAHPOUR, S. Design and optimization of alginate chitosan pluronic nanoparticles as a novel meloxicam drug delivery system. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(28).2015.

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine*. v. 20, p. 615-621, 2013.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N., & BENITA, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceuticals*, 55(1), R1-R4.

FLORENCE, A. T., FLORENCE, A., ATTWOOD, D., & ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. Edusp, 2003.

FLORES, F. C., RIBEIRO, R. F., OURIQUE, A. F., ROLIM, C. M. B., SILVA, C. D. B. D., POHLMANN, A. R., ... & GUTERRES, S. S. (2011). Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Química Nova*, 34(6), 968-972.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, p. 671-674, 2005.

FONSECA, Y. M., CATINI, C. D., VICENTINI, F. T., CARDOSO, J. C., CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L., & VIEIRA FONSECA, M. J. (2011). Efficacy of

marigold extract loaded formulations against UV induced oxidative stress. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(6), 2182-2193.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R., MASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 934-940, 2007.

FRANCISCHETTI, IEDA; MORENO, JOSÉ BITU; SCHOLZ, MARTIN AND YOSHIDA, WINSTON BONETTI. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [online]. 2010, vol.25, n.4 [cited 2016-05-18], pp.575-584. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382010000400023&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0102-7638. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382010000400023>.

FRANCISCONI, Lucilaine Silva. Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FU X, KAO JL, BERGT C, KASSIM SY, HUQ NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem*;279:6209–6212, 2004.

GALVIN, P., THOMPSON, D., RYAN, K. B., MCCARTHY, A., MOORE, A. C., BURKE, C. S., VOLKOV, Y. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(3), 389-404, 2012.

GARCÍA, DINAH; PUPO, SANDRA; CRESPO, MARITZA; FUENTES, LETICIA, Estudio Farmacognóstico de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano Cimarrón) *Rev Cubana Plant Med* 1998;3(1):31-36

GENTILE, P., CHIONO, V., CARMAGNOLA, I., & HATTON, P. V. An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659, 2014

GIBBS, B.F.; KERMASHA,S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. “Encapsulation in the food industry: a review”, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, pp. 213-224, 1999.

GIRAO VC, NUNES-PINHEIRO DC, MORAIS SM, SEQUEIRA JL, GIOSO MA. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. *PrevVet Med*; 59: 95-102, 2003.

GOMES, F. do E. S. Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Físico-Química; Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GONZAGA, MARIA L.C. ; MENEZES, THIAGO M.F. ; REBÊLO, LUCIANA M. ; DE SOUZA, JOSÉ R.R. ; RICARDO, NÁGILA M.P.S. ; SOARES, SANDRA DE A. . Agaricus brasiliensis mushroom betaglucans solutions: Physicochemical properties and griseofulvin solubilization by self-assembly micro-nano particles formation. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* , v. 4, p. 144-154, 2014.

GRIFFI, G., WYLLIE, S.G., MARKHAM, J.L., LEACH, D.N., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 14, 322–332.

GUIMARÃES, L.G.L; CARDOSO, M.G.; SOUZA, R.M. ZACARONI, A.B.; SANTOS, G.R. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 2, p. 267-275, 2014.

GUIMARÃES, P. P., OLIVEIRA, M. F., GOMES, A. D., GONTIJO, S. M., CORTÉS, M. E., CAMPOS, P. P., SINISTERRA, R. D. PLGA nanofibers improves the antitumoral effect of daunorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 248-255, 2015.

HADINOTO, K., SUNDARESAN, A., & CHEOW, W. S. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 427-443, 2013.

HAGENS, W.I.; OOMEN, A.G.; JONG, W.H.; CASSEE, F.R. Sips What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body *Regul Toxicol Pharmacol*, 49, p. 217, 2007.

HASEGAWA, Y., HIGASHI, K., YAMAMOTO, K., & MORIBE, K. (2015). Direct Evaluation of Molecular States of Piroxicam/Poloxamer Nanosuspension by Suspended-State NMR and Raman Spectroscopies. *Molecular pharmaceutics*, 12(5), 1564-1572.

HATANAKA, J., SHINME, Y., KURIYAMA, K., UCHIDA, A., KOU, K., UCHIDA, S., ... & ONOUE, S. (2011). In vitro and in vivo characterization of new formulations of St. John's wort extract with improved pharmacokinetics and anti-nociceptive effect. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 26(6), 551-558.

HUNTER, Robert J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. Academic press, 2013.

IANNITELLI, A.; GRANDE, R.; STEFANO, A. D.; GIULIO, M. D.; SOZIO, P.; BESSA, L. J., LASSERRA, S.; PAOLINI, C.; PROTASI, F.; CELLINI, L. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5039-5051, 2011.

JANORIA, K. G., & MITRA, A. K. Effect of lactide/glycolide ratio on the in vitro release of ganciclovir and its lipophilic prodrug (GCV-monobutyrates) from PLGA microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 338(1), 133-141, 2007.

JENTZSCH, P. V., RAMOS, L. A., & CIOBOTĂ, V. (2015). Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry. *Cosmetics*, 2(2), 162-176 *Flavour and Fragrance Journal*.

Jentzsch, V.P., & Ciobotă, V. (2014). Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils., 29(5), 287-295.

JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F. Composição química do óleo essencial de três espécies do gênero *Lippia* cultivadas em Sergipe. IN: 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

JOSE, S.; JUNA, B. C.; CINU, T. A.; JYOTI, H.; ALEYKUTTY, N. A. Carboplatin loaded Surface modified PLGA nanoparticles: Optimization, characterization, and in vivo brain targeting studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 307-314, 2016.

K. BOUCHEMAL, S. BRIANÇON, E. PERRIER, H. FESSI, Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 280, Issues 1–2, 6 August 2004, Pages 241-251, ISSN 0378-5173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>.

KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KLEBANOFF, S. J. KETTLE, A. J., ROSEN, H., WINTERBOURN, C. C., & NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 93, p. 185-198, 2013.

KLEBANOFF, S.; Myeloperoxidase: friend and foe, *J. Leucocyte Biol.* 77 598–625, 2005.

KOBAYASHI, S. D., VOYICH, J. M., & DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes and Infection*, 5(14), 1337-1344, 2003.

KOPPRASCH, S., PIETZSCH, J., & GRAESSLER, J. Validation of different chemiluminescent substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. *Luminescence*, 18(5), 268-273, 2003.

KWON, G. S., & OKANO, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), 107-116, 1996.

LAOUINI, A., CHARCOSSET, C., FESSI, H., HOLDICH, R. G., & VLADISAVLJEVIĆ, G. T. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes- investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E. *RSC Advances*, 3(15), 4985-4994, 2013.

LAPA, A.J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5.ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007. 119 p.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H. DEISSAGUET, J.P., Polymeric nanocapsules as drug delivery systems – A review. *STP Pharma Sci.*, 9, 411-418, 1999.

LEITE, E. A., VILELA, J. M. C., MOSQUEIRA, V. C. F., & ANDRADE, M. S. (2005). Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 11(S03), 48-51, 2005.

LEMONS, T. L. G., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., CLARK, A. M., & MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, 4(2), 82-84, 1990.

LIMA, R. K. *et al.* Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ciência & Agrotecnologia*, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.

LIOLIOS, C.C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. “Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity”, *Food Chem.*, vol. 112, pp. 77-83, 2009.

LIU, H., & CHEN, J. Indomethacin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and characterization. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 63(3), 207-216, 2009.

LOCH NECKEL, G., & LEMOS SENNA, E. (2005). Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do ácido poli (D, L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido Poli (D, L-lático) e polietilenoglicol. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24.

LOPES, C. C., & SALGADO, H. R. Development of a validated stability-indicating LC assay and stress degradation studies of linezolid in tablets. *Chromatographia*, 69(2), 129-135, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil – nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002

LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. 366 p. 1 ed , Editora E-papers, 2001.

MAGENHEIM, B.; Benita; S.; *S.T.P. Pharma Sci.* 1991, 1, 221.

MAHAPATRO, A., & SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnol*, 9(55), 1-11, 2011.

MAIA, W. J. Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA) contendo progesterona. 2014. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

MAKADIA, H. K., & SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397, 2011. <http://doi.org/10.3390/polym3031377>

MALLE, E., FURTMÜLLER, P. G., SATTLER, W., & OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *British journal of pharmacology*, 152(6), 838-854, 2007.

MARCO, S. L. Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar co-encapsulados dissertação (mestrado) em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2009.

MASON, T. G., WILKING, J. N., MELESON, K., CHANG, C. B., & GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635, 2006.

MATOS FJ. Plantas medicinais - guia de seleção e emprego de plantas medicinais usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil, 2. ed, Ed UFC, Fortaleza, 2007.

MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A.; SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 2004. 445 p.

MATOS, FRANCISCO JOSE DE ABREU, Introdução a Fitoquímica Experimental 3ªed Editora da Universidade Federal do Ceara – UFC Fortaleza, Ceará, 148p, 2009.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 62-66, 2004.

MCGAW, L. J., & ELOFF, J. N. (2008). Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 559-574.

MELO, MARCO TÚLIO PINHEIRO DE; RIBEIRO, JULIANA MARTINS; MEIRA, MESSULAN RODRIGUES; FIGUEIREDO, LOURDES SILVA DE; MARTINS, ERNANE RONIE. Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita, *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.7, p.1166-1169, jul, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n7/a5411cr4573.pdf>

MELO, N. F. S. D., GRILLO, R., FRACETO, L. F., DIAS FILHO, N. L., PAULA, E. D., ARAÚJO, D. R. D., & ROSA, A. H. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. *Química Nova*, 65-69, 2010.

MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, SANTOS TC, COUBE CS, LEITÃO SG. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytother. Res.* 15: 127–130, 2001.

MICHELIN DANIELE CARVALHO, FINATI SUELLEN CRISTIANE GANDOLFO, SACRAMENTO LUIS VITOR SILVA, VILEGAS WAGNER, SALGADO HÉRIDA

REGINA NUNES. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. Rev. bras. farmacogn. [serial on the Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Feb 28] ; 20(1): 18-22. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000100005&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100005>.

MIDWINTER, R. G.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. Hypochlorous acid stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway enhances cell survival. Arch Biochem Biophys. v. 394, p. 13-20 , 2001.

MONTAGU, A., SAULNIER, P., CASSISSA, V., ROSSINES, E., EVEILLARD, M., & JOLY-GUILLOU, M. L. (2014). Aromatic and terpenic compounds loaded in lipidic nanocapsules: activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* assessed in vitro and in a murine model of sepsis. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2014.

MONTEIRO, M. V. B., DE MELO LEITE, A. K. R., BERTINI, L. M., DE MORAIS, S. M., & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 378-382, 2007.

MONTENEGRO, R. C. ; NASCIMENTO, CGH ; FARIAS, Rômulo Augusto F ; LEYVA, A. ; PESSOA, Claudia ; MORAES, MO . Avaliação da atividade citotóxica de compostos isolados da *Lippia sidoides* em diferentes linhagens leucêmicas humanas. In: XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2000, Recife-PE. XVI Simpósio de Plantas Mediciniais, 2000.

MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J Agric Food Chem, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MORAES, C. M., PAULA, E. D., ROSA, A. H., & FRACETO, L. F. (2010). Physicochemical stability of poly (lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic Bupivacaine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 995-1000.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G.; *J. Pharm. Sci.* 2000, 89, 614.

MUÑOZ-ACEVEDO, A., KOUZNETSOV, V. V., & STASHENKO, E. E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. *Salud UIS*, 41, 287-294.

MUSUMECI, T., VENTURA, C. A., GIANNONE, I., RUOZI, B., MONTENEGRO, L., PIGNATELLO, R., & PUGLISI, G. (2006). PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *International journal of pharmaceutics*, 325(1), 172-179.

NACCACHE, P. H.; SHA'AFI, R. I.; BORGEAT, P. Mobilization, metabolism and biological effects of eicosanois in polymorphonuclear leucocytes, 2^a ed., CRC, Boston, 1990.

NAH, J. W., JEONG, Y. D., & KOH, J. J. Drug release from nanoparticles of Poly (DL-lactide-co-glycolide). *Korean Journal of Chemical Engineering*, 17(2), 230-236, 2000.

NEVES, B. R. A., VILELA, J. M. C., & ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução, *Cerâmica* v.44, n.290, p. 212-219, 1998.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B. B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Letter Applied Microbiology*. 39: 395-400. 2004.

NUNES, ROGÉRIA DE SOUZA ; LIRA, ANA AMÉLIA MOREIRA ; XIMENES, EULÁLIA ; SILVA, JOSÉ ALECSANDRO ; SANTANA, DAVI PEREIRA DE . Caracterização da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) como matéria-prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. *Revista Scientia Plena*, v. 1, n. 7, 2005. Disponível em: http://www.scientiaplena.org.br/sp_v1n7p182_184.pdf

OLIVEIRA M.L.M., Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. 113 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará , Fortaleza-CE, 2009a.

OLIVEIRA, A. G.; SILVA, A. R. A. ; SILVA, E.J., COMPLEXOS MOLECULARES DE INDOCIANINA COM CICLODEXTRINAS E ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA NA ÁREA DE OFTALMOLOGIA. *Diretório de Projetos Tecnológicos da Unesp, São Paulo*, v. 1, p. 20-20b, 2003.

OLIVEIRA, C.L.C.G. Desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de estabilidade de linezolida em comprimidos. 2009.196 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara-SP, 2009b.

OLIVEIRA, E.F.; PAULA,H.C.B.; DE PAULA,R.C.M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 113, 1 January (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776513005559)2014, Pages 146-151, ISSN 0927-7765, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.038>.

OLIVEIRA, F. P. D., LIMA, E. D. O., SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. D., SOUZA, E. L. D., SANTOS, B. H. C., & BARRETO, H. M. (2006). Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 510-516, 2006a.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(1), 36-44, 2015.

OLIVEIRA, M. L. M., BEZERRA, B. M. O., LEITE, L. O., GIRÃO, V. C. C., & Nunes-Pinheiro, D. C. S. (2014). Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. Essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. *Journal of ethnopharmacology*, 153(1), 283-289.

OLIVEIRA, R. D., LIMA, E. O., VIEIRA, W. L., FREIRE, K. R. L., TRAJANO, V. N., LIMA, I. O., SOUZA E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R. N. (2006). Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn*, 16(1), 77-82.

OLIVEIRA, V. C., MOURA, D. M., LOPES, J. A., DE ANDRADE, P. P., DA SILVA, N. H., & FIGUEIREDO, R. C. (2009). Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitology research*, 104(5), 1053-1059, 2009.

PAULA, H.C. B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F.O. M. S.; PAUL, R. C. M.. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(12), 2359-2366, 2010. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010001200025>

PEREIRA, M. A. Nanocápsulas: preparação, caracterização e marcação com ^{99m}Tc-HMPAO para estudos de biodistribuição em modelo experimental de inflamação. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós –Graduação em ciências Farmacêuticas, Universidade Federal e Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PIERDONÁ, TAIANA MAGALHÃES ; LIMA, NATHALIA ROCHA ; RODRIGUES, RAONY CÁSSIO MILLET ; TEIXEIRA, JONAS PIRES ; GONÇALVES, ROMÉLIA PINHEIRO ; Fontenele, Juvenia Bezerra ; VASCONCELOS, SILVÂNIA MARIA MENDES ; DE BARROS VIANA, GLAUCE SOCORRO ; Leal, Luzia Kalyne Almeida Moreira . The *Operculina macrocarpa* (L.) urb. (jalapa) tincture modulates human blood platelet aggregation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, p. 151-157, 2014

PINHO L, SILVA SOUZA PN, SOBRINHO EM, DE ALMEIDA AC, MARTINS ER. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from rosemary, pepper tree, barbatimao and erva baleeira leaves and from pequi peel meal. *Ciênc Rural*. 2012; 42 (2): 326-31.

POHLMANN, A. R., FONSECA, F. N., PAESE, K., DETONI, C. B., CORADINI, K., BECK, R. C., & GUTERRES, S. S. Poly (-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 10(5), 623-638, 2013.

PRABHU, K.S.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR , A.A.; SHIRWAIKAR, A. *Ocimum gratissimum*: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties *The Open Complementary Medicine Journal*, 2009, 1, 1-15.

PROKOP, A., & DAVIDSON, J. M. Nanovehicular intracellular delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(9), 3518-3590, 2008.

RAI, S., & RAI, A. Nanotechnology-The secret of fifth industrial revolution and the future of next generation. *Nusantara Bioscience*, Vol. 7, No. 2, pp. 61-66, 2015.

RENNEN, H. J. J. M.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nuclear Med.*, v. 28, n. 2, p. 241-252, 2001.

RIBEIRO, F. A. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000100029&lng=en&nrm=iso>. access on 05 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>.

ROCHA- FILHO PA, CAMARGO MFP, FERRARI M, MARUNO M (2014) Influence of Lavander Essential Oil Addition on Passion Fruit Oil Nanoemulsions: Stability and In vivo Study. *J Nanomed Nanotechnol* 5:198. doi:10.4172/2157-7439.1000198

RODRÍGUEZ, J., MARTÍN, M. J., RUIZ, M. A., & CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41-59, 2016.

ROMEIRO, R. da S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, v. 279, 2001.

ROSA, C. G., MACIEL, M. V. D. O. B., DE CARVALHO, S. M., DE MELO, A. P. Z., JUMMES, B., DA SILVA, T., ... & BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 337-344, 2015.

ROSA, H. B.; TOLOTTI, R. C.; MIRON, D. S. ; SOUZA, K. C. B. Desenvolvimento e validação de método para o doseamento de tibolona em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím. Nova* [online]. 2012, vol.35, n.5, pp.1030-1035. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000500030>.

ROTE N. Inflammation. In: *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. McCANCE K.L., HUETHER S.E. (Ed.) 3.ed. St. Louis: Mosby, cap.7, 205-236, 1998.

SAH, E., & SAH, H. Recent trends in preparation of poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 61, 2015.

SAINT-CRICQ de GAULEJAC, N.S.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by diferente methods. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 425-431, 1999.

SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho, 276p. 2 ed. Editora Unesp, 1996. ISBN 9788571398689.

SANKAR, R., KARTHIK, S., SUBRAMANIAN, N., KRISHNASWAMI, V., SONNEMANN, J., & RAVIKUMAR, V. (2015). Nanostructured delivery system for Suberoylanilide hydroxamic acid against lung cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 51, 362-368.

SANTANA, D. P.; FONSECA, S. G. C.; BEDOR, D. C. G.; LEAL, L. B.; SILVA, J. A. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, 29, 261-6, 2008.

SANTOS, S. S., LORENZONI, A., FERREIRA, L. M., MATTIAZZI, J., ADAMS, A. I., DENARDI, L. B., CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1389-1394, 2013.

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. *Quim. Nova*, v. 26, p. 726-37, 2003.

SCHIEVEN, G. L., DE FEX, H., & STEPHENSON, L. Hypochlorous Acid Activates Tyrosine Phosphorylation Signal Pathways Leading to Calcium Signaling and TNF á Production. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(3), 501-507, 2002.

SCHMITT, M., & POPP, J. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty first century. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(13), 20-28, 2006.

SCHOONBROODT, S.; LEGRAND-POELS, S.; BEST-BELPOMME, M.; PIETTE, J. *Biochem J.* v. 321, p. 777-85, 1997. Schoonbroodt, S., S. Legrand-Poels, M. Best-Belpomme, J. Piette. 1997. Activation of the NF-êB transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* 321: 777

SCHUH, Roselena S.; BRUXEL, Fernanda; TEIXEIRA, Helder F.. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 37, n. 7, p. 1193-1198, 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000700015&lng=en&nrm=iso>. access on 06 May 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140186>.

SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A., PINHO, S. C., & SOUTO, E. B. Biodegradable synthetic polymers: raw-materials and production methods of microparticles for drug delivery and controlled release. *Polímeros*, 21(4), 286-292, 2011.

SHAHIDI, F., & ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781, 2015.

SHARMA, S., PARMAR, A., KORI, S., SANDHIR, R. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016.

SHEPPARD, F.R.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; MCLAUGHLIN, N.J.D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation, *J.Leucocyte Biol.* 78 (2005) 1025–1042.

SIMÕES et al. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 5ª ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 2003, p.467

SINKO, P.J. *Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas* 5 ed, Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2008.

SIQUEIRA-MOURA, M. P., PRIMO, F. L., ESPREAFICO, E. M., & TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1744-1752, 2013.

SIVIRA A, SANABRIA ME, VALERA N, VASQUEZ C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neot Entomol.* 2011; 40 (3): 375-9.

SKOOG, D.A., HOLLER. F.J., NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, 2002.

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1), 1-20.

SOUTO, E. B., SEVERINO, P., & SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros-Parte I. *Polímeros*, 22(1), 96-100, 2012(a).

SOUTO, E. B., SEVERINO, P., & SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados–Parte II. *Polímeros*, 22(1), 101-106, 2012(b).

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000100024&lng=en&nrm=iso>. access on 05 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000100024>.

STEFANELLI, L.C.J. Experimentação animal: considerações éticas, científicas e jurídicas. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 15, p. 187-206, 2011.

SUN, S. B., LIU, P., SHAO, F. M., & MIAO, Q. L. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 19670, 2015.

TADROS T, IZQUIERDO P, ESQUENA J, SOLANS C Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 108-109: 303-18 2004.

TEIXEIRA, B., MARQUES, A., RAMOS, C., NENG, N. R., NOGUEIRA, J. M., SARAIVA, J. A., & NUNES, M. L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595, 2013.

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

Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*®, 63(5), 620-624.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1561-1568. 2002.

VALCOURT, C.; SAULNIER, P.; UMERSKA, A.; ZANELLI, M.P.; MONTAGU, A.; ROSSINES, E.; JOLY-GUILLOU, M.L Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *Int J Pharm* 2016 Feb 2;498(1-2):23-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.042>

VECCHIONE, R., LUCIANI, G., CALCAGNO, V., JAKHMOLA, A., SILVESTRI, B., GUARNIERI, D., ... & NETTI, P. A. (2016). Multilayered silica-biopolymer nanocapsules with a hydrophobic core and a hydrophilic tunable shell thickness. *Nanoscale*, 8(16), 8798-8809.

VENTURINI, C.G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; Formulation of lipid core nanocapsules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 375, Issues 1–3, 5 February 2011, Pages 200-208, ISSN 0927-7757, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.011>.

VERAS, H. N., ARARUNA, M. K., COSTA, J. G., COUTINHO, H. D., KERNTOPF, M. R., BOTELHO, M. A., & MENEZES, I. R. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytotherapy research*, 27(2), 179-185, 2013 (b).

VERAS, H. N., RODRIGUES, F. F., BOTELHO, M. A., MENEZES, I. R., COUTINHO, H. D., & COSTA, J. G. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arabian Journal of Chemistry* 2013 (a).

VIANA, G.S.B; LEAL, L.K.A.M.; VASCONCELOS, S.M.M. [Organizadoras] Plantas Medicinais da Caatinga Fortaleza Expressao Grafica e Editora, 2013 492p

VILE, G. F.; ROTHWELL, L. A.; KETTLE, A. J. Hypochlorous Acid Activates the Tumor Supression Protein p53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 359, p. 51-56, 1998

VILLANOVA, J. C., ORÉFICE, R. L., & CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, 20(1), 51-64, 2010.

WALKER, G.; BELL, S.E.J.; VANN, M.; JONES, D.S.; ANDREWS, G. Fluidised bed characterisation using Raman spectroscopy: Applications to pharmaceutical processing, *Chemical Engineering Science*, Volume 62, Issue 14, July 2007, Pages 3832-3838, ISSN 0009-2509, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2007.04.017>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250907003223>)

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1990.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Volume 4, Number 1, March 2008, pp. 80-89(10)

WIŃCEK, A. E., & ADRYAŃCZYK, E. Interfacial properties of phosphatidylcholine-based dispersed systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(25), 6489-6496, 2015.

WINEFORDNER J.D., *Treatise on Analytical Chemistry*, 432 p. Part 1, Volume 13, Thermal Methods Part 1, Volume 13 Edition, Jhon Wiley & Sons Inc. 1993

WOLFE, K. L., & LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8896–8907, 2007.

YOON, H.S., MOON, S.C., KIM, N.D., PARK, B.S., JEONG, M.H., YOO, Y.H., 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 151–156.

YURGEL, V., COLLARES, T., & SEIXAS, F. Developments in the use of nanocapsules in oncology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(6), 486-501, 2013.

ZANETTI-RAMOS, B. G., & CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. *Revista Brasileira de Farmácia*, 89(2), 95-101, 2008.

ZHANG, T., & YOUAN, B. B. C. Analysis of process parameters affecting spray-dried oily core nanocapsules using factorial design. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1422-1431, 2010.

ZOCCAL, J.V.M. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂ pelo método do precursor polimérico: UFSCar, 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos-SP, 2010.

Anexos

ANEXO 1 -AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE TIMOL EM OELS

RESUMO DOS RESULTADOS	
<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999697121
R-Quadrado	0,999394334
R-quadrado ajustado	0,999091501
Erro padrão	1166,825499
Observações	4

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4493095983	4493095983	3300,151	0,000302879
Resíduo	2	2722963,491	1361481,746		
Total	3	4495818947			

RESULTADOS DE RESÍDUOS			
<i>Observação</i>	<i>Previsto(a)</i> 235548,444444444	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	263900,5333	55,24444444	0,057986691
2	293877,5111	-746,0666667	-0,783100236
3	323854,4889	1326,4	1,392240398
4	353831,4667	-635,5777778	-0,667126853

ANEXO 2 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE TIMOL

RESUMO DOS RESULTADOS	
<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999867939
R-Quadrado	0,999735895
R-quadrado ajustado	0,999669869
Erro padrão	30461,98107
Observações	6

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,40503E+13	1,40503E+13	15141,51011	2,6159E-08
Resíduo	4	3711729162	927932290,4		
Total	5	1,4054E+13			

RESULTADOS DE RESÍDUOS			
<i>Observação</i>	<i>Previsto(a)</i> 89391,6666666667	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	232506,0014	3472,998571	0,127468087
2	723283,1605	-8041,49381	-0,295143752
3	1214060,32	33653,34714	1,23516543
4	2441003,217	-45707,21714	-1,677573832
5	3667946,115	-3418,114762	-0,125453708
6	4404111,853	20040,48	0,735537776

·
·
·