

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Departamento de Farmácia

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO ALFA-BISABOOL PARA O TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS

Orientando: Edson Aiel Teixeira de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Dr. Ricardo Ferreira Nunes

Brasília - DF

2021

EDSON ALIEL TEIXEIRA DE ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO ALFA-BISABOOL PARA O TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS

Monografia apresentada ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel
em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Dr. Ricardo Ferreira Nunes

Brasília - DF

2021

“Sempre que via o sol, eu lembrava que estava olhando para uma estrela. Uma entre mais de cem bilhões em nossa galáxia. Uma galáxia que era apenas uma entre bilhões de outras galáxias no universo observável. Isso me ajudava a manter as coisas em perspectiva. “

Cline, Ernest.

Dedico a minha mãe, Eva Aparecida, que nunca mediu esforços para me permitir focar nos estudos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Edson Aliel Teixeira de Almeida

Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo alfa-bisabolol para o tratamento de queimaduras

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Eva Aparecida, que sempre deu tudo de si para me permitir focar completamente nos meus estudos e nunca me preocupar com nada. Inúmeras vezes foi meu ponto de refúgio e ouviu todas as minhas histórias mesmo esquecendo 5 minutos depois, você que me permitiu chegar aonde cheguei.

Ao meu irmão, Marcos Paulo, que leu esse trabalho diversas vezes sem entender nada só para me ajudar, você foi um exemplo que eu sempre busquei seguir. Obrigado por tantas vezes fazer o papel de irmão mais velho e me incentivar a estudar.

Ao meu pai, Eider Marcos, que mesmo distante se mostra presente para qualquer coisa, me apoia no que for preciso e não me desampara. À Viviane Pereira por se tornar uma grande amiga, com quem posso contar para sair, passar horas fofocando e sempre me fazer sentir em casa.

Um grande obrigado ao meu professor orientador, Guilherme Gelfuso, que acreditou em mim, mesmo entrando na pesquisa bem cedo durante graduação e até hoje me oferecer projetos para meu desenvolvimento acadêmico. Ao meu (antigo) pai acadêmico Ricardo Ferreira por ser muito paciente, por oferecer a casa para eu dormir durante os experimentos, por fazer inúmeras coisas em todos os meus projetos, sem você tudo teria sido muito mais difícil. Obrigado aos dois por sempre se mostrarem dispostos a responder minhas dúvidas e por todo o aprendizado que me ajudaram a obter.

A todos que fazem parte do LTMAC e já me ajudaram de alguma forma nos meus projetos, mesmo não nos conhecendo direito todos foram muito receptivos e prestativos.

Aos meus amigos da Farmácia por passar horas brincando e deixar até as piores aulas interessantes. Obrigado por todo o tempo estudando ou conversando, isso que me deu saúde mental para continuar, mesmo quando não aguentava mais a faculdade. Um agradecimento especial a Marina Dias e Fernanda Baldomir que se tornaram o melhor grupo que eu poderia querer, vocês acreditaram em mim mesmo quando eu não conseguia. Ao Carlito e ao Luiz Moenich por toda a ajuda e atenção. Obrigado também a Kimberly Miranda que me acompanhou desde o primeiro semestre, sempre pude contar com você para qualquer coisa.

Aos meus amigos do “Eva02”, vocês tornam qualquer encontro perfeito, mesmo depois de tantos anos continuam me dando apoio em tudo. Um obrigado especial a Gabriele Louise que me incentivou a estudar todos os dias e me ajudou durante toda a escrita desse trabalho.

Aos meus amigos do grupo “unidos do RU” que conseguiam me deixar animado na fila do intercampi as 4h da manhã todo dia. Em especial para a Melissa Ribeiro por

toda carona e todos os momentos que passamos juntos desde o fundamental e ao Yuri Silvestre que mesmo distante fez muita diferença durante a minha graduação.

À Universidade de Brasília por toda oportunidade que me deram de aprendizado e crescimento. Agradeço o investimento na minha graduação e em todos os recursos para a compra de material para meus experimentos. Ao fomento do CNPq pela bolsa de estudos que me deram durante a graduação pelo meu projeto de iniciação científica.

Ao Breno Noronha por aceitar fazer parte da avaliação desse trabalho e contribuir com seu aprimoramento.

RESUMO

ALMEIDA E.A.T. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo alfa-bisabolol para o tratamento de queimaduras. Brasília, 2021. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação tópica estável e não irritante para a incorporação do (-)- α -bisabolol para ser usada no tratamento de queimaduras cutâneas. Para a quantificação do fármaco foi validado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) considerando-se os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme as diretrizes da Anvisa (2017), FDA (2015) e ICH (2005). Foram desenvolvidas nanoemulsões O/A e nanopartículas de PCL para os experimentos. Um diagrama de fases pseudo-ternário usando Kolliphor® ELP e Span® 80 (3: 1 w/w) foi obtido para escolher a melhor proporção de água, óleo e surfactante. A nanoemulsão era composta por 90% de água, 9% de surfactante e 1% de (-)- α -bisabolol e a nanopartícula manteve a mesma concentração do fármaco na formulação. As nanoemulsões apresentaram um tamanho de $14,04 \pm 0,8$, com valores de PDI de $0,132 \pm 0,02$, potencial zeta de $+7,5 \pm 1,9$ mV e valores de pH de $3,95 \pm 0,01$. Já as nanopartículas têm tamanho de $288 \pm 2,8$, PDI de $0,092 \pm 0,017$, potencial zeta de $-4,7 \pm 0,4$ mV e pH de 4,7. Ambas as formulações são mais estáveis na temperatura de geladeira com teor de $84,95 \pm 2,69$ e $69,3 \pm 8,00$ respectivamente, indicando a necessidade do uso de antioxidante e seu armazenamento em baixas temperaturas. Nenhum processo físico como turbidez, opacidade ou separação de fases foi observado após 60 dias de armazenamento em ambas as temperaturas. A nanoemulsão foi capaz de aumentar a penetração de (-) - α -bisabolol cerca de $\sim 3,7$ vezes na pele intacta, $\sim 1,7$ vezes na pele queimada com água quente (85°C) e $\sim 2,3$ vezes na pele queimada com placa (90°C), quando comparada à solução controle (solução (-) - óleo α -bisabolol). Já a nanopartícula aumentou a penetração do fármaco em 40,9; 2,4 e 3 vezes com a pele nessas condições respectivamente. No ensaio *in vitro* HET-CAM a nanoemulsão não apresentou nenhum sinal de irritação. Em conclusão, as formulações contendo o (-)- α -bisabolol parecem ser sistemas promissores para aplicação tópica, o que possibilita seu uso em tratamentos de queimaduras cutâneas.

Palavras-chave: Queimadura de pele, validação analítica, (-)- α -bisabolol, nanopartículas, nanoemulsão.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop a stable, non-irritating topical formulation for the incorporation of (-)- α -bisabolol to be used in the treatment of skin burns. For the drug quantification, an analytical method was validated by high performance liquid chromatography (HPLC) considering the parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit and quantification limit, according to the guidelines of Anvisa (2017), FDA (2015) and ICH (2005). O/A nanoemulsions and PCL nanoparticles were developed for the experiments. A pseudo-ternary phase diagram using Kolliphor® ELP and Span® 80 (3: 1 w/w) was obtained to choose the best ratio of water, oil, and surfactant. The nanoemulsion was composed of 90% water, 9% surfactant and 1% (-)- α -bisabolol and the nanoparticle maintained the same drug concentration in the formulation. The size of the nanoemulsions were 14.04 ± 0.8 , with PDI values of 0.132 ± 0.02 , zeta potential of $+7.5 \pm 1.9$ mV and pH values of 3.95 ± 0.01 . Both formulations are more stable at refrigerator temperature with a content of 84.95 ± 2.69 and 69.3 ± 8.00 respectively, indicating the need for the use of antioxidant and its storage at low temperatures. No physical process such as turbidity, opacity or phase separation was observed after 60 days of storage at both temperatures. The nanoemulsion was able to increase the penetration of (-) - α -bisabolol about ~ 3.7 times in intact skin, ~ 1.7 times in hot water burnt skin (85°C) and ~ 2.3 times in the skin burned with plaque (90°C) when compared to the control solution (solution (-) - α -bisabolol oil). The nanoparticle increased drug penetration by 40.9; 2.4 and 3 times with the skin under these conditions respectively. In the *in vitro* HET-CAM assay, the nanoemulsion did not show any signs of irritation. In conclusion, formulations containing (-)- α -bisabolol seem to be a promising system for topical application, which enables its use in treatments for skin burns.

Keywords: Skin burn, analytical validation, (-)- α -bisabolol, nanoparticles, nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema evidenciando a estrutura anatômica da pele.	4
Figura 2: Estrutura química do (-)- α -bisabolol. Peso molecular:222,36.	7
Figura 3: Modelos de pele avaliada no estudo, tais como a pele intacta (1), pele queimada com água quente à 85°C por 5 s (2) e pele queimada com chapa quente à 90°C por 2 s (3).	14
Figura 4: Diagrama de fases pseudoternário. Cada vértice representa as proporções de água, óleo e tensoativo. Os pontos indicam as composições adquiridas durante o experimento que foram classificadas como nanoemulsão.....	16
Figura 5: Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da NP α -b no aumento de 30.000 e 10.000, respectivamente.....	20
Figura 6: Características visuais do controle, NE α -b e NP α -b durante 60 dias na temperatura ambiente (25 °C) e na geladeira (6°C).....	23
Figura 7: Comparação entre formulações utilizadas na membrana corioalantóide após a aplicação das formulações. O controle negativo corresponde ao soro fisiológico 0,9% e o controle positivo é uma solução de NaOH 1 mol/L. Teste feito com a NE e NE α -b	25
Figura 8: Gráfico relacionando a quantidade de fármaco recuperado (μ g/cm ²) após a permeação de 12h da NE α -b e NP α -b com o controle (1% alfa-bisabolol em óleo de girassol).....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados dos experimentos realizados para validação do método cromatográfico de análise do alfa-bisabolol em amostras contendo interferentes de pele.....	15
Tabela 2: Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (-mV), pH e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) da NE e da NE α -b . Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).....	17
Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (-mV), pH e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) da NP e da NP α -b . Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).....	19
Tabela 4: Resultados do ensaio de estabilidade das nanoemulsões. Tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta (+ mV), pH e conteúdo (%) do NE α -b armazenado à temperatura ambiente (25 ° C) e geladeira (6 ° C). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).	20
Tabela 5: Resultados do ensaio de estabilidade das nanopartículas. Tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta (- mV), pH e conteúdo (%) do NP α -b armazenado à temperatura ambiente (25 ° C) e geladeira (6 ° C). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).	22
Tabela 6: Resultado do ensaio de estabilidade para a formulação controle. Teor em % na temperatura ambiente (25 °C) e na geladeira (6 °C). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	23

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de vigilância Sanitária
CAM	Membrana corioalantóide
CLAE	Cromatógrafo Líquido de alta eficiência
EHL	Equilíbrio hidrofílico/lipofílico
FDA	Foods and drugs administration
HET-CAM	Ensaio teste da membrana corioalantóide de ovos de galinha (do inglês, hen's egg chorioallantoic membrane test)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NE	Nanoemulsão sem o alfa-bisabolol
NE α -b	Nanoemulsão contendo o alfa-bisabolol
nm	nanometro
NP α -b	Nanopartícula contendo o alfa-bisabolol
O/A	Óleo/água
p/p	Peso/peso
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersão
R ²	Coefficiente de correlação múltipla
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SUS	Sistema único de saúde
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. PELE	4
3.2. QUEIMADURAS	5
3.3. TRATAMENTOS	6
3.4. ALFA BISABOLOL	7
3.5. FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. MATERIAL	10
4.2. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFA BISABOLOL EM ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	10
4.3. OBTENÇÃO DAS NANOEMULSÕES	11
4.3.1. INCORPORAÇÃO DO ALFA-BISABOLOL (NE α -b).....	11
4.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS (NP α -b)	11
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES	12
4.6. MORFOLOGIA.....	13
4.7. ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES.....	13
4.8. ENSAIO DE IRRITABILIDADE IN VITRO HET-CAM	13
4.9. ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	13
4.10. ANÁLISE DOS DADOS	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	15
5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO	16
5.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	18
5.4. MORFOLOGIA.....	19
5.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE	20
5.6. ESTUDO DE IRRITABILIDADE <i>IN VITRO</i>	24
5.7. ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	25
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e age como primeira barreira de defesa do organismo, mantendo a homeostase do interior enquanto o protege contra o meio exterior (TORTORA; DERRICKSON, 2016). Quando comprometida por queimaduras, efeitos deletérios como inflamação, dor e infecção no local podem se manifestar, chegando até mesmo a serem prejudiciais em nível sistêmico (NEGUT *et al.*, 2018).

A queimadura é um problema universal que pode atingir qualquer pessoa. Anualmente quase 11 milhões de pessoas são acometidas por ela, sendo 2 milhões só no Brasil. Por conta disso, o Sistema único de Saúde (SUS) destina cerca de 55 milhões de reais para o seu tratamento anualmente (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2016).

De maneira geral, queimadura é um trauma tecidual causado por agentes que liberam calor, sejam através de energia elétrica, energia térmica ou substâncias químicas (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2016). Sua classificação é realizada segundo a extensão e profundidade da lesão, sendo as lesões superficiais, médias e profundas classificadas em graus 1, 2 e 3, respectivamente (SILVA, R. L. M. *et al.*, 2016)

O primeiro medicamento incluso na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) para tratar esse tipo de ferimento foi a pomada contendo sulfadiazina, e ainda hoje é utilizada como parte da terapia padrão. Apesar disso, esse tratamento não consegue acelerar a cicatrização no local da lesão tornando-se necessária a busca por novos princípios ativos para lidar com as queimaduras (BOLGIANI; SERRA, 2010).

O alfa-bisabolol é uma substância que já vem sendo utilizada para esse fim por possuir propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antimicrobianas (VILA *et al.*, 2010). Porém, o uso é limitado por conta da sua estabilidade, dado que é facilmente oxidado em condições ambientais e, devido à sua lipossolubilidade ($\text{Log } P = 3,8$) tem maior dificuldade de penetrar nas camadas mais internas da pele para atuar adequadamente (D'ALMEIDA *et al.*, 2017).

A veiculação de fármacos em sistemas nanotecnológicos, como no caso das nanoemulsões e nanopartículas, parece uma alternativa interessante para promover a administração tópica do alfa-bisabolol. As nanoemulsões, por exemplo, são sistemas coloidais constituídos por dois líquidos imiscíveis, sendo que um deles está distribuído dentro do outro na forma de nanogotículas estabilizadas por um sistema tensoativo. Elas são preparadas por um método dependente de alta energia (ASSIS *et al.*, 2012). O tamanho de gotículas oleosas reduzido desses sistemas e a alta superfície de contato devem favorecer uma maior estabilização do fármaco na formulação além de uma maior interação com a pele após a aplicação (D'ALMEIDA *et al.*, 2017). Desta forma, espera-se uma melhora nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados nesses sistemas (FERREIRA-NUNES *et al.*, 2018) uma vez que eles podem atuar favorecendo a penetração

do fármaco na pele, o que deve garantir uma maior concentração do fármaco no local da lesão (DOH *et al.*, 2013).

As nanopartículas são sistemas carreadores esféricos e sólidos com diâmetros menores que 1 μm . Essas estruturas podem ser preparadas utilizando um polímero para veicular o fármaco, podendo ter a estrutura de uma nanoesfera ou nanocápsula. No caso do alfa-bisabolol, por possuir propriedades oleosas, espera-se obter uma nanocápsula em que o fármaco vai formar um núcleo oleoso envolto por uma cápsula polimérica (GUTERRES *et al.*, 2007). Alguns estudos mostram que, por ser um sistema sólido, essa tecnologia tende a controlar mais a liberação do seu conteúdo em comparação com a nanoemulsão (HE *et al.*, 2013) além de conferir maior estabilidade ao princípio ativo.

Portanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver dois sistemas de liberação nanoparticulado para a incorporação do alfa-bisabolol, uma nanoemulsão e uma nanopartícula polimérica, e comparar a estabilização do ativo e a promoção de sua permeação cutânea por cada um dos sistemas, visando a uma nova alternativa para o tratamento tópico de queimaduras.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é desenvolver, caracterizar e avaliar *in vitro* uma nanoemulsão e uma dispersão de nanopartículas poliméricas contendo alfa-bisabolol como sistemas terapêuticos inovadores para melhorar a estabilidade do fármaco na formulação e estimular sua penetração na pele para o tratamento de queimaduras.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

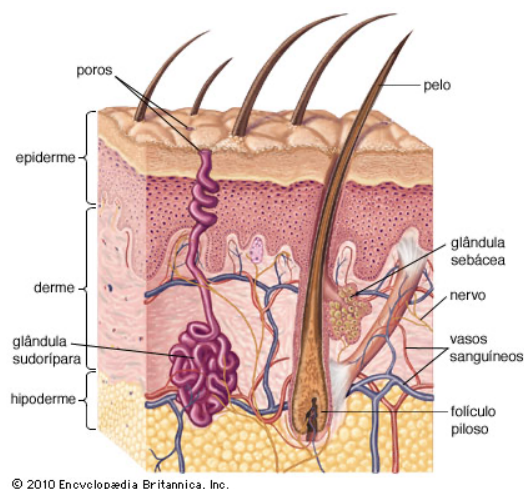
- Desenvolver e validar um método analítico preciso e seletivo para a quantificação do alfa-bisabolol
- Obter dois sistemas nanoestruturados para a incorporação do alfa-bisabolol
- Caracterizar as formulações desenvolvidas quanto ao tamanho de partícula/gotícula, índice de polidispersividade, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a estabilidade dos sistemas desenvolvidos durante 60 dias armazenados em temperatura ambiente e em temperatura de geladeira;
- Avaliar o potencial de irritabilidade das nanoformulações;
- Avaliar a penetração cutânea *in vitro* do fármaco a partir das formulações;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, cobrindo 1,5 a 2 metros quadrados do nosso corpo, permitindo a interação com o ambiente através do sentido do tato. Isso é possível devido à sensibilidade relacionada às terminações nervosas presentes ao longo de sua estrutura, dessa forma reconhecemos texturas, mudanças de pressão, de temperatura e a ocorrência de dor (ROOSTERMAN *et al.*, 2006).

Figura 1. Esquema evidenciando a estrutura anatômica da pele.



A pele também tem papel essencial na sobrevivência humana por manter a homeostase através das suas funções básicas, como: controlar a transferência de substâncias do exterior com o interior, regulação térmica, síntese da vitamina D, osmoregulação, proteção imunológica, além de agir como importante barreira física (TORTORA; DERRICKSON, 2016). A sua estrutura possui características que impedem quase toda substância química de penetrar no organismo e assim, também se apresenta como um desafio para a penetração de compostos que possam ser benéficos como os fármacos (MORIMOTO *et al.*, 1992). De maneira simplificada, a estrutura da pele é dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme.

A epiderme é a porção mais externa constituída de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e é composta por 5 camadas. Entre essas, a mais interna e próxima da derme é a camada basal, constituída por uma única camada de queratinócitos e melanócitos com alta atividade mitótica. Em seguida vem a camada espinhosa, com células conectadas para ser resistente a atritos e possui tonofilamentos e feixes de filamentos de queratina. A próxima camada é a granulosa, seus queratinócitos são mais achatados e possui grânulos lamelares que cria uma barreira que auxilia na

impermeabilização da epiderme. A segunda camada mais externa é a lúcida, é a última que possui células vivas, presente nas regiões das mãos, pés e nos lábios. Por fim, a camada mais superficial é o estrato córneo, ele é formado por células queratinizadas anucleadas e planas, ricas em queratina, essas células criam ligações cruzadas e cria resistência e assim se torna essa barreira impermeável (CORRÊA, 2012; JUNQUEIRA et al., 2017)

A derme é a camada intermediária e mais espessa da pele, variando de acordo com a região e a idade do indivíduo, está logo acima da hipoderme. Sua estrutura é formada por fibras de colágeno e elastina, é nela que se encontra os vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e as sudoríparas, ela serve para a sustentação e a nutrição da epiderme (BROWN; KRISHNAMURTHY, 2021). Por fim, tem a hipoderme, ela é a camada mais interna, sua estrutura é formada por adipócitos. Essas células são responsáveis por armazenar gordura, servindo como reserva energética e juntas fornecem proteção mecânica contra impactos. (CORRÊA, 2012; JUNQUEIRA et al., 2017)

Essa barreira serve como um revestimento externo para proteger o interior do organismo de agentes que possam gerar danos físicos, químicos, mecânicos ou radioativos (TORTORA; DERRICKSON, 2016). Seu comprometimento pode gerar inflamação, dor, infecção ou quadros mais graves. Portanto, quando há algum tipo de trauma, como a queimadura, é imprescindível o cuidado com a área afetada o mais rápido possível. (NEGUT *et al.*, 2018).

3.2. QUEIMADURAS

As queimaduras são lesões cutâneas traumáticas, provocada por contato direto com agentes químicos ou físicos, sejam eles vindos de uma fonte de calor, por corrente elétrica, radiação, fogo, líquidos inflamáveis além de sólidos, líquidos ou gases aquecidos. Esse trauma gera danos físicos, funcionais e psicossomais ao acometido e dependendo da gravidade, pode levá-lo a óbito (LACERDA et al., 2010; FERREIRA; PAULA, 2013).

A classificação da queimadura é realizada segundo a extensão e profundidade da lesão. As queimaduras de primeiro grau afetam somente a epiderme, sendo caracterizada por eritema, dor e edema. As de segundo grau, chegam a afetar a derme, formando bolhas ou flictemas. Já as de terceiro grau, atingem a derme, epiderme e pode alcançar estruturas mais internas, chegando até nos músculos e tendões (SILVA, R. L. M. *et al.*, 2016).

Dependendo do trauma, mecanismos da pele, como sua capacidade de reter água e manter a temperatura corpórea podem ser prejudicados. No caso de detrimento da função de “barreira protetora” do organismo, o sentido do tato também pode ser danificado. Em uma queimadura de terceiro grau, por exemplo, as terminações nervosas do local são tão

afetadas que esse nível de trauma tem como propriedade ser indolor (MONTES *et al.*, 2011).

As queimaduras podem afetar homens e mulheres de todas as idades e grupos étnicos, sejam por razões domésticas, seja pelo trabalho que desempenham. Ainda assim, estimativas globais indicam que 95% dos casos de óbitos decorrentes de queimaduras ocorrem em países de baixa a média renda (SOUZA; LIMA, *et al.*, 2021). No período de 2001 a 2010 os índices de queimadura no Estados Unidos tiveram média de 16,4 mil casos/ano (média de 0,005% dos atendimentos hospitalares), enquanto o Brasil, um país em desenvolvimento obteve média de 1 milhão de casos/ano, (média de 0,504% dos casos)(FERREIRA; PAULA, 2013).

Estima-se que no Brasil as queimaduras são responsáveis por acometer cerca de 2 milhões de pessoas a cada ano. De acordo com o estudo feito por Gawryszewski (2012), os mais acometidos são homens entre 30 e 49 anos, seguidos de homens entre 20 e 29 anos. Anualmente, o SUS destina cerca de 55 milhões de reais para o tratamento dos pacientes acometidos com queimaduras, incluindo as internações (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2016)

3.3. TRATAMENTOS

O primeiro medicamento incluso na RENAME para tratamento de queimaduras no Brasil foi a pomada contendo sulfadiazina. Esse princípio ativo tem a capacidade de prevenir e controlar o crescimento microbiano por bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, servindo para profilaxia e no tratamento de infecções nas áreas afetadas. Seu uso se estende em outros tratamentos, como adjuvante em infecção de úlcera de pele e de decúbito (FERREIRA; PAULA, 2013)

Ainda hoje, o tratamento tópico mais comum para queimaduras consiste na administração de medicamentos contendo sulfadiazina de prata 1%, em conjunto com gaze embebida em soro fisiológico e aplicação de curativos oclusivos. Esse tratamento protege o ferimento contra infecções locais, mas não é capaz de acelerar o processo de cicatrização da lesão(BOLGIANI; SERRA, 2010).

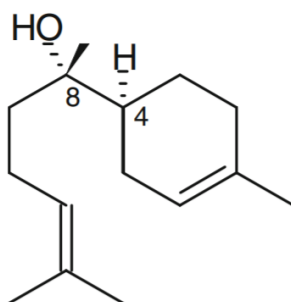
Para queimaduras de 2º e 3º grau já existem outros tratamentos mais invasivos que ainda estão em estudo, como o uso da pele de tilápia. Essa pele tem o objetivo de agir como um curativo oclusivo por possuir resistência semelhante à do couro e a sua estrutura morfológica é semelhante à da pele humana. Mesmo apresentando resultados promissores, atualmente, sua utilização não é viável em larga escala, por se tratar de um material nobre, é dispendioso, não é disponível para utilização doméstica, não é adequado para pequenas feridas e ainda está em estudo quanto a sua utilização para esse fim (JÚNIOR *et al.*, 2020, LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Para um tratamento adequado buscando a recuperação do paciente é preciso considerar a dor provocada na área, a formação da cicatriz, os medicamentos disponíveis pelo SUS, a redução dos índices de infecções locais, sistêmicas entre outras (FERREIRA; PAULA, 2013). Sendo assim, faz-se necessário a pesquisa de novas formas de tratamento que, além de ser antimicrobiano, consiga auxiliar o corpo em sua recuperação, possua fácil administração e seja facilmente escalonado, como é o caso do alfa-bisabolol.

3.4. ALFA BISABOLOL

O alfa-bisabolol, também conhecido como levomenol, é um álcool sesquiterpênico de ocorrência natural extraído de diversas plantas, principalmente das partes aéreas da espécie *Matricaria chamomilla* sp. (Asteraceae), popularmente chamada de “camomila”. Ele possui propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antimicrobianas (TOMIČ *et al.*, 2014; VILA *et al.*, 2010) que podem ser bem aproveitadas no tratamento de queimaduras. Atualmente, ele tem sido utilizado em produtos cosméticos (BHATIA *et al.*, 2008; PERBELLINI *et al.*, 2004) e há estudos mostrando efeitos como protetor gástrico, antitumoral (SILVA, A. P. *et al.*, 2010), antifúngicas, antitumoral (LEITE *et al.*, 2012), entre outros (VILA *et al.*, 2010).

Figura 2: Estrutura química do (-)- α -bisabolol. Peso molecular:222,36.



Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, de acordo com alguns estudos, sabe-se que a sua ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição de citocinas pró-inflamatórias como a INOS e a COX-2. O alfa-bisabolol age na via de sinalização dos fatores de transcrição AP-1 e NF-Kb impedindo a sua ação. Ao bloquear esses mediadores, a síntese da citocina pró-inflamatória NF-kB é prejudicada diminuindo a inflamação (JUNIOR, 2018). Já as suas propriedades antimicrobianas já foram descritas para leveduras como a *C.albicans* e bactérias gram-positiva *S.aureus*, inibindo seu crescimento (BEZERRA, 2009).

Este fármaco possui como maior limitação para uso a sua estabilidade, sendo facilmente oxidado no ambiente externo, formando dois óxidos de bisabolol (D'ALMEIDA

et al., 2017). Além disso, não há ainda na literatura estudos que comprovem a sua penetração cutânea após aplicação tópica em uma pele lesada, o que está diretamente relacionado à extensão do efeito que ele irá desempenhar na pele queimada. Sabe-se ainda que fármacos lipofílicos, como é o caso do alfa-bisabolol, interagem com o estrato córneo da pele (uma camada altamente lipofílica) impedindo o seu transporte para as outras camadas mais internas (BANDO *et al.*, 1997) e conseqüentemente afetando sua ação no local desejado.

Portanto, faz-se necessário veicular este fármaco em novos sistemas de liberação que ajudem a preservar sua estabilidade, evitando a oxidação, além de permitir que haja a absorção para as camadas mais internas da pele, e não fique somente acumulado no estrato córneo, que é uma camada mais superficial lipofílica da pele, que dependendo do grau de queimadura pode estar totalmente ausente. Sendo assim, neste trabalho será considerado o uso de nanoemulsões e nanopartículas para carrear o fármaco.

3.5. FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS

Os sistemas carreadores de fármaco, como a nanoemulsão e as nanopartículas, são estudados por diminuírem a toxicidade de ativos, solubilizarem ativos lipofílicos, melhorarem o efeito do ativo no tecido alvo e poderem ser facilmente escalonado (MEHNERT; MÄDER, 2012).

O prefixo nano é utilizado para nomear estruturas que possuem, em pelo menos uma de suas dimensões, medidas manométricas (escala calculada como um milionésimo do milímetro). Sistemas com essa nomenclatura apresentam propriedades funcionais únicas relacionadas principalmente com sua área de contato, visto que vão conseguir interagir melhor com a matriz na qual estão inseridas quando comparadas com formulações encontradas na escala macro (CHAU *et al.*, 2007)

As nanoemulsões são constituídas por dois líquidos imiscíveis (aquoso e oleoso) separados em uma fase dispersa e outra continua sendo estabilizada por um tensoativo. Diferente das emulsões, essa estrutura é transparente ou translúcida, possui um diâmetro de 50-1000 nm e tem boa estabilidade contra sedimentação (ASSIS *et al.*, 2012). Também, devido à sua composição e estruturação conseguem favorecer a penetração de fármacos na pele, sendo um carreador que pode promover uma liberação rápida do fármaco, o que deve garantir uma maior concentração deste no local da lesão (DOH *et al.*, 2013).

As nanopartículas poliméricas possuem uma estrutura semelhante às gotículas das nanoemulsões, mas são sólidas à temperatura ambiente. Também formam um sistema coloidal quando dispersas em água, seu tamanho característico ainda é motivo de debate, mas de maneira geral, consideramos que são menores que 1 µm. Esse sistema também foi desenvolvido para encapsular, estabilizar e distribuir componentes lipofílicos como

lipídios bioativos e drogas, se diferenciando no método de preparo e por ter uma maior capacidade de controlar a liberação do fármaco na área (ASSIS *et al.*, 2012).

Nessas estruturas, o fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a matriz selecionada e, dependendo de algumas propriedades, podem se diferir em nanoesferas ou nanocapsulas. As nanoesferas possuem uma matriz em que a droga está fisicamente e uniformemente dispersa em sua estrutura. Já a nanocapsula possui uma cavidade rodeada por um polímero formando uma membrana para “isolar” o fármaco do meio em que está inserido (MOHANRAJ; CHEN, 2007).

O alfa-bisabolol possui propriedades hidrofóbicas, então, espera-se que o sistema desenvolvido seja de nanocapsulas. Essa estrutura possui um núcleo aquoso ou é preenchido com um solvente lipofílico, podendo ser considerado um reservatório para o fármaco. Suas vantagens em comparação a outros sistemas, inclusive as nanoesferas, são numerosas se mostrando promissoras para a veiculação do fármaco.

A nanocápsula possui um revestimento interno que protege essa cavidade central, assim o fármaco não entra em contato direto com o tecido em que foi aplicado, controlando a liberação e impedindo a “explosão” do fármaco, consequentemente diminuindo a irritação no local de administração. Além disso, essa proteção se estende para a própria formulação, protegendo a droga contra degradação pelo ambiente, tanto no armazenamento quanto após a sua administração. Outra vantagem em relação à nanoesfera é a carga em porcentagem de fármaco que pode ser introduzida na partícula. Caso o solvente do núcleo seja um bom solvente para o fármaco, a carga em seu interior pode ser aumentada. (COUVREUR *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que dependendo das propriedades físico-químicas e a composição do fármaco e das nanocápsulas, o fármaco pode ser incluído tanto no núcleo central quanto se adsorver na superfície. Alguns estudos até utilizaram nanopartículas para administrar simultaneamente fármacos hidrofílicos e lipofílicos.

Sendo assim, a utilização do alfa-bisabolol nos sistemas carreadores mencionados pode ser uma alternativa interessante para melhorar a estabilidade do fármaco e permitir que ele interaja melhor com a matriz biológica que for inserido, desempenhando sua função antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante que são essenciais para a recuperação das queimaduras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O padrão analítico de (-)- α -bisabolol (99,9%, lote: #LRAC4860) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O alfa-bisabolol PA (> 95%, lote 185322) foi adquirido pela Iberoquímica Magistral (São Paulo, Brasil). O Kolliphor[®] ELP (EHL: 15) e o Span[®]80 (EHL: 4,3) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). A PCL (PM 14,000 Da) e o Pluronic[®] F127 foram obtidos da Sigma-Aldrich (Japão). O Tween[®] 80 (TW80) foi obtido da Sigma-Aldrich (França). A acetona utilizada para a produção da nanopartícula, o etanol e a acetonitrila grau HPLC usados para procedimentos de extração e análises cromatográficas eram todos de tipo CLAE e foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil). O ácido fosfórico grau HPLC foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha). Os filtros de seringa hidrofóbicos 0,45 μ m foram adquiridos na analítica (São Paulo, Brasil). O óleo de girassol foi comprado em um supermercado local. A água utilizada em todas as preparações era do tipo ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

A pele de orelha de suínos foi obtida de um abatedouro local (Sabugi Alimentos, Brasil), excisada com bisturi e tesoura, lavada em água e congelada a -4°C por no máximo 2 meses antes do uso. Os ovos de galinha embrionados foram obtidos na granja Avifran (Planaltina, Brasil). A membrana de acetato de celulose (Fisherbrand) utilizada nos experimentos de liberação foi obtida da Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). O Vivaspin[®] foi adquirido da Sartorius (Goettingen, Alemanha).

4.2. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFA BISABOLOL EM ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Para a quantificação de alfa-bisabolol, foi validado um método analítico por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Este método foi desenvolvido considerando-se os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme as diretrizes da Anvisa (2017), FDA (2015) e ICH (2005).

Alíquotas de 20 μ L das amostras foram injetadas em CLAE (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna Luna[®] C₁₈ (Shimadzu, 300 mm \times 3,9 mm; 10 μ m; 100 Å). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila e ácido fosfórico 0,01 mol/L (30:70 v/v), com a temperatura do forno ajustada para 40°C e vazão de 1,2 mL/min. A detecção foi feita no ultravioleta (UV) em 200 nm.

4.3. OBTENÇÃO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram obtidas através da construção de um diagrama de fases pseudoternário, com o objetivo de determinar as melhores proporções de água, óleo e sistema tensoativo para compor a nanoformulação. Foi utilizado óleo de girassol na fase oleosa, água ultrapura para a fase aquosa e os tensoativos selecionados foram Kolliphor[®] ELP e Span[®]80 na proporção de 3:1 (p/p), obtendo um EHL (equilíbrio hidrófilo lipófilo) igual a 12,33.

Os tensoativos foram dissolvidos na fase oleosa nas proporções (p/p) de (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7), (2:8) e (1:9), à temperatura ambiente. Cada mistura de tensoativo e fase oleosa foi titulada continuamente, gota a gota, com água sob agitação mecânica (1000 rpm). Os sistemas obtidos foram deixados em repouso por 5 minutos e classificados segundo o aspecto observado: separação de fases, leitoso, turvo, floculação ou nanoemulsão.

4.3.1. INCORPORAÇÃO DO ALFA-BISABOLOL (NE α -b)

Após a obtenção do diagrama de fases pseudoternário, selecionou-se uma nanoemulsão. O alfa-bisabolol foi adicionado como sendo a fase oleosa da nanoemulsão (1%). Após homogeneização desta fase com os tensoativos (9,0%), foi adicionada a fase aquosa (90,0%). Esta mistura foi colocada no sonicador de ponta (Sonics Vibra Cell[®]) à 40% de amplitude, pulsos de 5 s (on) e 5 s (off) por 10 min, em banho de gelo, para garantir a homogeneidade do sistema. Após esse processo foi obtido a nanoemulsão contendo o alfa-bisabolol (NE α -b).

A nanoemulsão sem o fármaco (NE) foi preparada da mesma forma, porém em vez do fármaco foi mantido 1% de óleo de girassol.

4.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS (NP α -b)

As nanopartículas foram desenvolvidas a partir da técnica de Badri (2017) adaptada para incorporação do alfa-bisabolol à 1% no volume final. Essa técnica utiliza duas fases formadas por líquidos imiscíveis, sendo uma orgânica e outra inorgânica. No desenvolvimento da nanopartícula contendo alfa-bisabolol (NP α -b), a fase orgânica foi preparada com 200 mg de alfa-bisabolol adicionado a uma solução contendo 150 mg de policprolactona (PCL) e 15 mL de acetona, misturados com um agitador magnético junto com um pequeno aumento de temperatura para completa solubilização do polímero (no máximo 30°C). Já para fase inorgânica foram misturados 100 mg de tween 80 com 20 mL de água com o uso de um agitador magnético. Com o uso de uma bureta, a fase orgânica foi gotejada lentamente na fase inorgânica em agitação magnética moderada (cerca de

400 rpm). Em seguida, a dispersão formada foi colocada em um rotaevaporar (R-100, Buchi, Suíça) até que a acetona fosse completamente evaporada.

A PCL foi escolhida para compor o sistema por ser um polímero biocompatível e biodegradável, o que diminuiria a chance de ser tóxico para aplicação tópica. Além disso, ela possui natureza lipofílica e apresenta grande penetrabilidade que podem favorecer na penetração do fármaco na pele (JIA *et al.*, 2008). Essas propriedades já foram aproveitadas em outros estudos, como no de Badri (2017) que utilizou a PCL para preparar nanopartículas contendo indometacina para aplicação tópica procurando ter efeito antiinflamatório e analgésico local, ou no de Saqib (SAQIB *et al.*, 2020) que utilizou o polímero para aplicação da Anfotericina B no tratamento de leishmaniose tegumentar.

A Nanopartícula sem o fármaco (NP) foi preparado da mesma forma, porém no lugar do fármaco foi adicionado 1% de óleo de girassol.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES

As gotículas das nanoemulsões e das nanopartículas foram analisadas pelo Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Esse equipamento utiliza o espalhamento de luz dinâmico para determinar o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (PDI) e a técnica de espalhamento de luz eletroforética para o potencial zeta. Preparou-se uma diluição das formulações na proporção de 1:50 (v/v) em água ultrapura antes da análise. O pH e a condutividade foram determinados utilizando um phmetro (DM-22, digimed, São Paulo) e um condutivímetro (CG1800, Gehaka, Brasil) pela inserção direta do eletrodo na amostra.

O conteúdo de alfa-bisabolol nas NE foi determinado usando um método cromatográfico validado (Seção 5.1) após diluição adequada das formulações em etanol.

A eficiência de encapsulação do fármaco nas NP foi determinada diluindo a NP α -b na proporção 1:50 (v/v) em água ultrapura. Em seguida, a amostra foi inserida em um dispositivo Vivaspin e centrifugada (1000 rpm) por 10 min. A amostra que passou pelo filtro (filtrado) foi analisada no HPLC e o valor obtido foi utilizado para cálculo da eficiência de encapsulação (EE%) de acordo com a Equação 1 (LÓPEZ-CABEZA *et al.*, 2021).

$$EE(\%) = \frac{m_{Total} - m_{Livre}}{m_{Total}} \times 100$$

Equação 1

em que m_{Total} é a massa obtida a partir da concentração teórica total do fármaco e m_{Livre} é a quantidade do α -bisabolol que passou pelo filtro considerado como não associado à nanopartícula.

4.5.1 MORFOLOGIA

A morfologia das nanopartículas poliméricas foi analisada pelas imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no equipamento JSM-700IF do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do IB/UnB. As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em água ultrapura e alíquotas de 20 µL foram colocadas em um suporte apropriado para sua análise.

Antes da análise das NP α-b, utilizou-se um suporte de metal com uma lamínula de vidro por cima para depositar a formulação. A amostra preparada foi deixada para secar em temperatura ambiente e em seguida foi metalizada com ouro para serem analisadas pelo equipamento.

As amostras foram analisadas em magnitudes de até 30.000 vezes de aumento.

4.6. ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES

As NE α-b O/A, as NP α-b e o controle contendo 1% do α-bisabolol em 99% de óleo de girassol foram acondicionadas em *ependorfs* e mantidas às temperaturas 25°C ± 2°C e 6°C ± 2°C por 60 dias. Aos dias 1, 7, 15, 30 e 60 dias após o preparo das amostras, a NE α-b e a NP α-b foram analisadas quanto ao pH, diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta. Para todas as formulações (incluindo o controle) foi observado o conteúdo de alfa-bisabolol (Seção 5.1) e as características organolépticas (características visuais, textura e odor).

4.7. ENSAIO DE IRRITABILIDADE IN VITRO HET-CAM

Os ensaios de irritabilidade apenas das nanoemulsões, que continham alta concentração de tensoativos com potencial irritante em sua composição, foram realizados usando ovos embrionados de galinha no 9º dia de incubação (LUEPKE; KEMPER, 1986; VINARDELL; MACIÁN, 1994). Os ovos foram colocados em uma superfície com o lado equatorial para cima, onde uma abertura de 2 x 2 cm foi criada para expor a membrana cório-alantóide (CAM). 300 µL de cada amostra-teste foram colocados diretamente na CAM. Após 20 s, as amostras foram lavadas com soro fisiológico (0,9% de NaCl em água) e observada visualmente durante 5 min (nos tempos 20 s, 2 min e 5 min) em relação ao aparecimento de qualquer um dos seguintes fenômenos: hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade, para os quais foi atribuída uma pontuação. Soro fisiológico e NaOH 1 mol/L foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

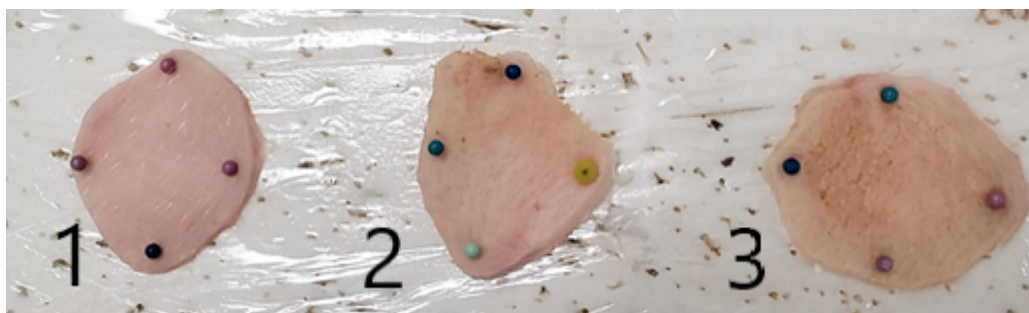
4.8. ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Foram utilizadas células de difusão do tipo Franz modificadas com a pele retirada da orelha de suíno separando o compartimento doador do receptor. O estrato córneo da pele

foi colocado voltado para cima. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução aquosa de Pluronic®F127 2,5% e no compartimento doador (área de difusão = 1,77 cm²) foram colocados 500 µL da solução CT (alfa-bisabolol dissolvido a 1% em óleo de girassol), da NE α-b e da NP α-b, todas contendo a mesma concentração do alfa-bisabolol. O meio receptor foi mantido a 32 ± 2°C sob agitação constante (400 rpm). No final do experimento (após 12 h do início), a pele foi removida da célula de difusão e picotada para extração do fármaco com a adição de 5 mL de etanol e deixada em repouso. Após 12 h de extração, as amostras foram filtradas através de um filtro hidrofóbico de 0,45 µm e o fármaco foi quantificado pelo método cromatográfico validado (Seção 5.1).

Para esse experimento foram utilizados 3 modelos de pele, conforme observado na Figura 3. O primeiro foi utilizado sem nenhuma alteração, sendo denominado de pele intacta; para o segundo modelo, a pele foi queimada em água quente (85°C) pela imersão durante 5 s. Para o terceiro modelo foi realizada a queimadura com chapa aquecida (90°C) durante 2 s (MITSUNAGA *et al.*, 2012).

Figura 3: Modelos de pele avaliada no estudo, tais como a pele intacta (1), pele queimada com água quente à 85°C por 5 s (2) e pele queimada com chapa quente à 90°C por 2 s (3).



ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados dos experimentos foram expressos como média ± desvio padrão da média de pelo menos 3 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *softwareGraphPadPrism*, com a significância estatística fixada em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver uma formulação nanoestruturada contendo alfa-bisabolol que seja estável, não irritante para a pele e que auxilie na penetração cutânea do fármaco para o tratamento tópico de queimaduras. Para isso, dois sistemas de liberação nanoestruturados foram desenvolvidos e tiveram seu desempenho comparados por meio de ensaios de caracterização, estabilidade, e permeação cutânea.

A primeira etapa foi a avaliação de um método analítico capaz de dosar o fármaco tanto nas formulações para sua caracterização e determinação da estabilidade, quanto nos extratos de pele, para avaliação de sua penetração cutânea.

5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico passou por uma validação simples no laboratório, por ter-se partido de um trabalho de validação já publicado (ALMEIDA et al., 2021). Para essa validação considerou-se os parâmetros de linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, segundo as diretrizes da Anvisa, ICH e do FDA. A Tabela 1 resume os resultados obtidos para esses testes.

Tabela 1: Resultados dos experimentos realizados para validação do método cromatográfico de análise do alfa-bisabolol em amostras contendo interferentes de pele.

Parâmetro avaliado	Valor encontrado	Especificação
Linearidade	$r^2=0,9997$; $y=29031x+451,07$	r^2 : superior à 0,9990
Seletividade	100,45% - 106,50%	Entre 85% – 115%
Limite de detecção	0,110 µg/mL	-
Limite de quantificação	0,335 µg/mL	-
Precisão	1,89% - 3,57%	Inferior à 5%
Exatidão	100,89% - 106,85%	Entre 85% - 115%

O método cromatográfico utilizado no estudo foi linear, uma vez que a curva analítica obtida na faixa de concentração entre 1,0 e 30,0 µg/mL apresentou valor do coeficiente de correlação múltipla (r^2) superior ao mínimo recomendado. Além disso, o método se mostrou seletivo aos interferentes da pele, tendo extraído aproximadamente 100% do fármaco das camadas da pele.

O método também foi preciso e exato, com porcentagens de precisão e exatidão inferiores aos recomendados, apresentou limite de detecção de 0,110 µg/mL e de quantificação de 0,335 µg/mL, sendo considerados baixos e adequados para a

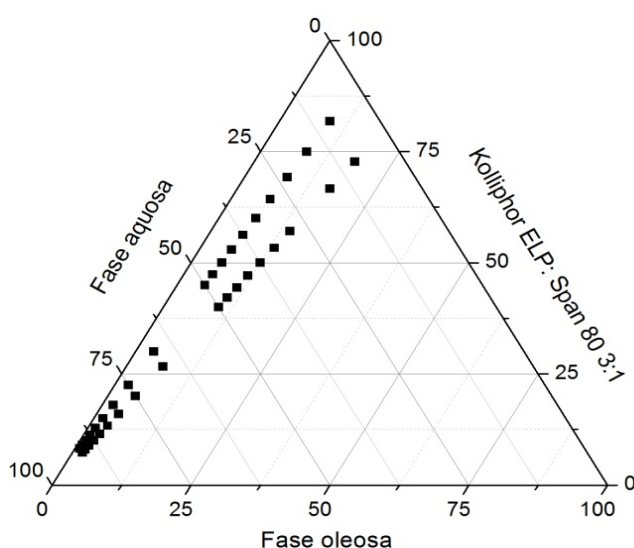
quantificação de alfa-bisabolol nos estudos de caracterização, estabilidade e penetração cutânea.

5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO

Os tensoativos não-iônicos Kolliphor[®] ELP e o Span[®]80 foram selecionados para preparar as nanoemulsões porque mantêm sua estabilidade independente da variação do pH e são menos tóxicos para os sistemas biológicos em comparação aos tensoativos iônicos (SOUSA *et al.*, 2017), o que é altamente requerido para uma formulação que será aplicada em pele lesada. Além disso, uma mistura de tensoativo permite obter sistemas mais estáveis devido à interação entre as cadeias laterais da molécula do tensoativo com os lipídeos da formulação (KONEVA *et al.*, 2017).

Uma mistura de Kolliphor[®] ELP e Span[®]80 na proporção de 3:1 (p/p) foi usada para preparar nanoemulsão O/A, uma vez que o EHL teórico deste tensoativo foi de 12,33. Valores altos de EHL indicam que a nanoemulsão formada é do tipo O/A (HONG *et al.*, 2018), o que seria ideal para manter o fármaco em sua fase interna, preservando sua estabilidade. Assim, foi utilizado essa mistura como a fase de tensoativo, óleo de girassol como fase oleosa e água ultra-pura como fase aquosa. O diagrama de fases pseudoternário para o sistema está apresentado na Figura 4.

Figura 4: Diagrama de fases pseudoternário. Cada vértice representa as proporções de água, óleo e tensoativo. Os pontos indicam as composições adquiridas durante o experimento que foram classificadas como nanoemulsão.



O diagrama de fases pseudoternário é um triângulo equilátero que representa 100% de algum componente em cada vértice, e por possuir um tensoativo e um co-tensoativo em uma proporção fixa de 3:1, foram representados juntos no mesmo vértice da Figura como uma única fase para a sua formação (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Na formação do diagrama foi possível observar uma grande área de obtenção de nanoemulsões. Contudo, foi selecionado o ponto que obteve a maior proporção de água e a menor concentração de tensoativo, para que o sistema proporcione a mais baixa taxa de irritação possível na pele. A nanoemulsão O/A escolhida foi composta por 90% de água, 1% de fase oleosa alfa-bisabolol e 9% de mistura Kolliphor® ELP eSpan®80 (3:1 p/p) utilizando um sonicador (Sonics Vibra Cell®) de ponta para homogeneizar o tamanho das gotículas.

Cabe ressaltar que o sistema obtido, por ter formação espontânea, seria classificado por alguns autores como sendo uma microemulsão. No entanto, aqui usamos o termo genérico nanoemulsão, já que o tamanho de gotículas é inferior a 100 nm, como mostrado a seguir na caracterização da formulação, os dados estão apresentados tabela 2.

Tabela 2: Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (-mV), pH e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) da NE e da NE α -b. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Amostra	Diâmetro		Potencial	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	Hidrodinâmico (nm)	PDI	Zeta (mV)		
NE	28,5 \pm 1,0	0,282 \pm 0,068	-21,1 \pm 3,6	3,8	3,8
NE α -b	14,4 \pm 0,8	0,132 \pm 0,020	-7,5 \pm 1,9	3,4	147,0

O diâmetro médio das gotículas da NE α -b foi de 14,4 \pm 0,8 nm, a que continha o óleo de girassol na fase oleosa (nanoemulsão controle, NE) teve um tamanho médio de 28,5 \pm 1,0 nm. Assim, pode-se inferir que a diferença entre os óleos modificou o tamanho de gotícula da nanoformulação. O óleo de girassol possui baixa concentração de ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0) e uma alta concentração de ácidos graxos insaturados (cerca de 90%), principalmente ácido linoléico (18:2) (REGITANO *et al.*, 2016), enquanto o alfa-bisabolol é um álcool cíclico sesquiterpênico

Os valores de PDI para a NE α -b foram menores do que os encontrados na NE, indicando novamente que a fase oleosa é fator significativo para a diferença entre as características físicas das formulações. Os valores encontrados foram respectivamente

$0,13 \pm 0,02$ e $0,28 \pm 0,07$, indicando maior homogeneidade por parte da NE α -b por estar mais próximo do 0 (RAO, GECKELER, 2011).

O potencial zeta encontrado na NE α -b foi mais próximo de 0 do que a NE, o que poderia indicar uma maior instabilidade, pois somente valores de potencial acima de $\pm 30\text{mV}$ são associados a estabilidade por ter uma repulsão física das gotículas (ROLAND *et al.*, 2003). Já o pH é ácido, inferior ao pH da pele que é maior que 5 (ALI; YOSIPOVITCH, 2013), porém indicam ser seguros para uso tópico dermatológico tendo um resultado próximo do pH da pele e do encontrado em outros produtos cosméticos (LAMBERS, *et al.*, 2006, STAMATAS *et al.*, 2011).

Quanto à condutividade elétrica, há estudos indicando que apenas o seu valor não é o bastante para indicar a estabilidade das formulações por não haver uma relação linear entre os dois pontos (MASMOUDI *et al.*, 2005). Quando o valor da condutividade é alto é possível afirmar que a forma da nanoemulsão é de O/A (OLIVEIRA *et al.*, 2011), porém as formulações testadas não obtiveram valores significativos para isso. Contudo ao se observar a concentração dos constituintes das nanoemulsões é visível que a fase aquosa está na parte externa da formulação.

Os valores do potencial zeta e da condutividade se mostraram desfavoráveis para a NE α -b, podendo esses ser parte do motivo para a alteração do teor no final dos 60 dias do experimento de estabilidade (Seção 5.5).

5.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas são sistemas muito estudados para administração tópica de fármacos por possuir características estruturais fundamentais para seu direcionamento. As nanopartículas poliméricas formadas possuíam uma coloração branca e opaca. As NP α -b conseguiram encapsular a concentração de alfa-bisabolol que é utilizada nos produtos comerciais, que seria no máximo 1% (ANDERSEN, 1999). A Tabela 3 resume os dados de caracterização das nanopartículas contendo ou não o alfa-bisabolol.

Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (-mV), pH e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) da NP e da NP α -b . Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
NP	$537,9 \pm 2,69$	$0,092 \pm 0,026$	$-15 \pm 1,87$	4,9
NP α -b	$288,4 \pm 2,8$	$0,092 \pm 0,017$	$-4,7 \pm 0,4$	4,7

A NP e a NP α -b obteve um tamanho de $537,9 \pm 2,69$ e $288,4 \pm 2,8\text{nm}$, respectivamente. Essa diferença no tamanho entre elas também pode ter sido pela composição do óleo. Além disso, o seu tamanho se mostrou muito maior que o das emulsões, isso se deve pelo uso do polímero que possui uma conformação que aumenta o tamanho médio da partícula (RAO; GECKELER, 2011), porém se manteve abaixo dos $1\mu\text{m}$ característico da formulação. O valor encontrado do PDI foi de $0,092 \pm 0,017$ para a NP α -b e de $0,092 \pm 0,026$ para a NP, indicando alta homogeneidade por estarem próximos de 0 (JEISWAL *et al.*, 2015).

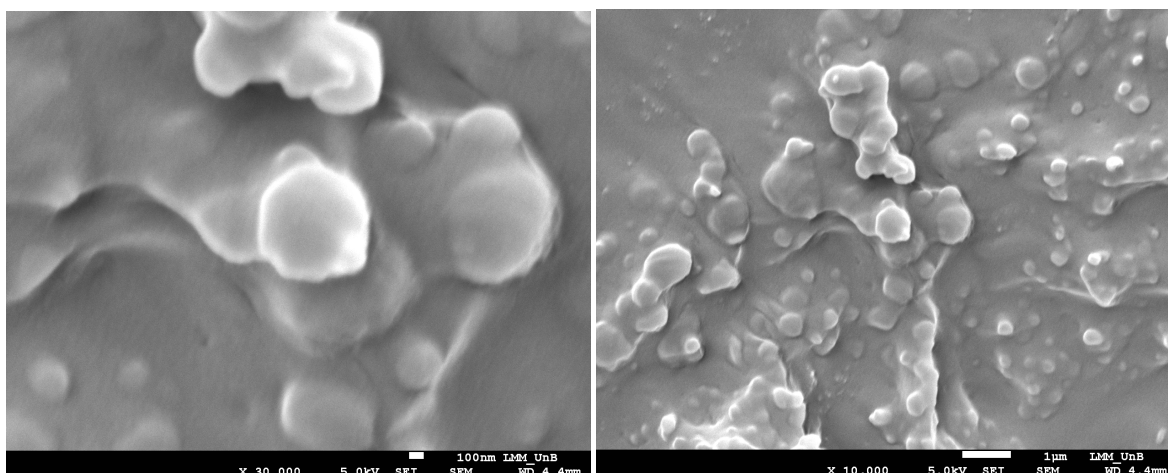
O potencial zeta encontrado na NP α -b ($-4,7 \pm 0,4$) foi mais próximo de 0 do que a NP ($-15 \pm 1,87$), o que pode indicar instabilidade por, como as emulsões, não estar acima dos $\pm 30\text{mV}$ associados a estabilidade da formulação (ROLAND *et al.*, 2003). O pH das nanopartículas foram de 4,7 para a NP α -b e de 4,9 para a NP, sendo mais próximos do pH da pele em comparação ao das nanoemulsões, indicando ser seguro para uso tópico dermatológico.

Os resultados encontrados na eficiência de encapsulação se mostraram muito promissores por apresentar o valor de $99,23 \pm 0,14 \%$, sendo maior do que os resultados encontrados em outros estudos (BYUN *et al.*, 2011, HOSSEINI *et al.*, 2013) que também utilizaram ativos oleosos em suas formulações.

5.4. MORFOLOGIA

Com o uso das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível capturar as imagens apresentadas na Figura 5

Figura 5: Imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da NP α -



b no aumento de 30.000 e 10.000, respectivamente

Nessas imagens foi possível observar que as nanopartículas possuem o formato prevalentemente esférico. Levando em consideração outros trabalhos da literatura, essa característica era esperada de nanocarreadores (ANGELO *et al.*, 2020, PIRES *et al.*, 2019). Observa-se também que as NP α -b apresentaram um tamanho próximo de 300 nm, o que está em conformidade com o valor médio encontrado na Tabela 3.

O MEV é uma técnica importante para visualizar superficialmente a estrutura das formulações, porém ela não é capaz de ser utilizadas em nanogotículas líquidas por conta das suas características físicas (TAKAKU *et al.*, 2015), inviabilizando sua utilização para a nanoemulsões. Pela literatura, sabe-se que as nanogotículas sempre são sistemas esféricos pois é a conformação que possui maior estabilidade em sistemas emulsionados líquidos (BARRADAS, HOLANDA E SILVA, 2021, ZDRALI, *et al.*, 2017). Nesse caso, só com os resultados encontrados nos ensaios com o zetasizer (seção 5.2) é possível caracterizar as nanogotículas morfológicamente.

5.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade das formulações contendo alfa-bisabolol foi observada quanto ao diâmetro das gotículas (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (mV), pH, teor (%) e características organolépticas por um período de 60 dias e em duas temperaturas distintas. Os resultados da nanoemulsão estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados do ensaio de estabilidade das nanoemulsões. Tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta (+ mV), pH e conteúdo (%) do NE α -b armazenado à temperatura ambiente (25 ° C) e geladeira (6 ° C). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).

Temperatura ambiente					
Tempo (dias)	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (-mV)	pH	Teor (%)
0	14,4 ± 0,8	0,13 ± 0,02	7,5 ± 1,9	3,39 ± 0,00	100,0 ± 1,20
7	15,3 ± 1,7	0,19 ± 0,10	6,0 ± 2,9	3,41 ± 0,01	86,50 ± 0,78
15	13,6 ± 0,3	0,06 ± 0,03	9,6 ± 4,2	3,37 ± 0,04	88,63 ± 5,15
30	14,0 ± 0,2	0,06 ± 0,02	1,8 ± 0,8	3,36 ± 0,02	75,25 ± 0,49
60	13,9 ± 0,1	0,06 ± 0,02	2,7 ± 1,5	3,26 ± 0,03	74,76 ± 2,34
Geladeira					
0	14,4 ± 0,8	0,13 ± 0,02	7,5 ± 1,9	3,39 ± 0,00	100,0 ± 1,20
7	14,1 ± 0,4	0,10 ± 0,01	2,2 ± 1,1	3,50 ± 0,01	91,48 ± 6,07
15	14,4 ± 0,2	0,14 ± 0,04	3,8 ± 2,0	3,49 ± 0,03	84,95 ± 2,96
30	13,9 ± 0,2	0,07 ± 0,02	1,0 ± 0,9	3,42 ± 0,03	81,53 ± 2,18
60	14,2 ± 0,0	0,08 ± 0,01	2,1 ± 1,9	3,42 ± 0,00	84,95 ± 2,69

O pH da NE α -b foi mantido a aproximadamente 3,0 a 3,5. De fato, não foram observadas alterações significativas ao longo dos 60 dias de avaliação ($p < 0,05$), mesmo para as formulações mantidas em temperatura ambiente. O tamanho das gotículas mantiveram-se com ligeiras alterações durante o período de armazenamento, mas não foram observadas alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os valores de PDI para todas as formulações também foram mantidos, permanecendo abaixo de 0,2, indicando que as gotículas da nanoemulsão foram preservadas em monodispersão (CHEONG *et al.*, 2008), um indicativo de estabilidade física, mesmo com potencial zeta quase zero.

O teor de alfa-bisabolol diminuiu ligeiramente após 60 dias de armazenamento, principalmente à temperatura ambiente. O conteúdo remanescente do fármaco nesta amostra foi de 74,76 ± 2,34%, enquanto para as amostras armazenadas na geladeira, o conteúdo remanescente foi de 84,95 ± 2,69%. Portanto, observa-se que o teor de alfa-bisabolol foi alterado por 60 dias e que a formulação permanece mais estável quando armazenada em geladeira. Porém, é importante ressaltar que nenhum antioxidante foi adicionado às formulações, o que aumentaria a estabilidade do fármaco na formulação.

O resultado desse teste para a NP α -b está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados do ensaio de estabilidade das nanopartículas. Tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta (- mV), pH e conteúdo (%) do NP α -b armazenado à temperatura ambiente (25 ° C) e geladeira (6 ° C). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3).

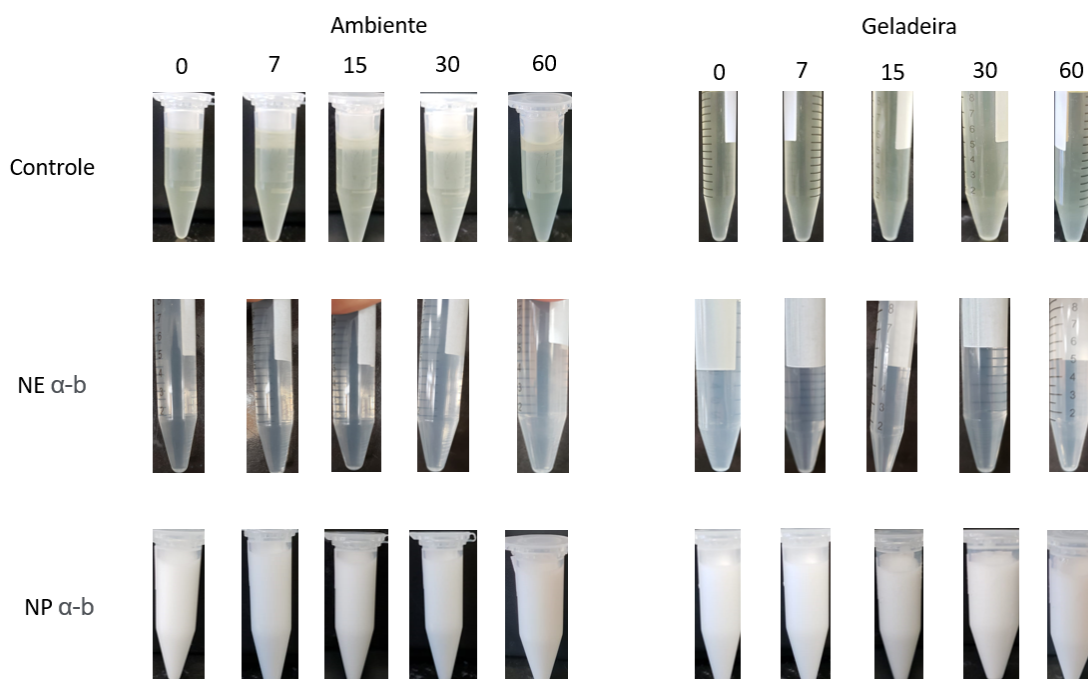
Temperatura ambiente					
Tempo (dias)	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (-mV)	pH	Teor (%)
0	288,3 \pm 2,8	0,091 \pm 0,02	4,7 \pm 0,5	4,71 \pm 0,01	100 \pm 1,42
7	316,4 \pm 5,0	0,137 \pm 0,02	16,0 \pm 4,9	4,11 \pm 0,07	99,99 \pm 1,60
15	303,8 \pm 5,1	0,135 \pm 0,02	19,2 \pm 1,3	4,04 \pm 0,07	88,49 \pm 9,51
30	288,1 \pm 4,6	0,097 \pm 0,02	15,6 \pm 1,6	3,88 \pm 0,05	77,63 \pm 5,64
60	259,4 \pm 10,9	0,080 \pm 0,02	17,7 \pm 0,4	4,25 \pm 0,16	46,39 \pm 2,88
Geladeira					
0	288,4 \pm 2,8	0,091 \pm 0,02	4,7 \pm 0,5	4,71 \pm 0,01	100 \pm 1,41
7	302,9 \pm 9,1	0,136 \pm 0,01	19,9 \pm 0,5	4,11 \pm 0,07	99,42 \pm 2,53
15	303,3 \pm 2,1	0,114 \pm 0,02	18,6 \pm 0,5	4,06 \pm 0,01	108,65 \pm 9,35
30	297,5 \pm 8,9	0,166 \pm 0,02	17,7 \pm 0,4	4,24 \pm 0,02	89,29 \pm 4,04
60	280,4 \pm 7,9	0,087 \pm 9,29	16,6 \pm 0,5	4,52 \pm 0,06	69,31 \pm 8,00

Após os 60 dias de análise, o tamanho médio da NP α -b obteve pequenas, mas significativas alterações estatísticas ($p < 0,05$) na temperatura ambiente, mas permaneceu na faixa de tamanho esperado, abaixo de 1 μ m, enquanto na temperatura de geladeira não houve diferença estatística ($p < 0,05$). Os valores de PDI também permaneceram abaixo de 0,2, indicando que manteve a monodispersão durante o período analisado, mesmo com o potencial zeta abaixo dos ± 30 . O pH também obteve pequenas, mas estatisticamente significativas alterações ($p < 0,05$), variando entre 4,0 e 5,0, aproximadamente, durante o período analisado. Mesmo com essa alteração o pH se manteve próximo ao pH da pele e de outros produtos cosméticos.

Após os 60 dias de análise, o teor do alfa-bisabolol foi alterado, principalmente na temperatura ambiente. O conteúdo remanescente das amostras armazenadas na geladeira foi de 69,31 \pm 8,00% e de 46,39 \pm 2,88% na temperatura ambiente. Portanto, é importante considerar o uso de antioxidantes e o armazenamento dessas amostras em geladeira para melhorar seu tempo de prateleira.

O resultado das características organolépticas das 3 formulações está apresentado a seguir, as fotografias das características visuais estão retratadas na Figura 6

Figura 6: Características visuais do controle, NE α -b e NP α -b durante 60 dias na temperatura ambiente (25 °C) e na geladeira (6°C)



Como é possível notar pelas fotografias, não foram observadas alterações visuais nas amostras, como turbidez, sedimentação, precipitação ou separação de fases. Todas as amostras permaneceram com aparência, cor e odor característicos, não havendo diferença aparente durante todo o ensaio.

Os resultados da formulação controle, onde 1% do fármaco está solubilizado em óleo de girassol, está apresentado na Tabela 6

Tabela 6: Resultado do ensaio de estabilidade para a formulação controle. Teor em % na temperatura ambiente (25 °C) e na geladeira (6 °C). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

Temperatura ambiente					
Tempo	0	7	15	30	60
Controle	100,0 \pm 7,23	80,80 \pm 12,3	71,32 \pm 2,49	82,35 \pm 4,58	79,89 \pm 4,54
Geladeira					
Controle	100,0 \pm 7,2	76,34 \pm 1,58	74,25 \pm 0,00	80,96 \pm 2,26	83,36 \pm 2,38

Os dois modelos de nanoestruturas estudados já são utilizados por melhorar a estabilidade de fármacos. Ao contrário do esperado, o fármaco apresentou maior estabilidade quando esteve imerso na solução oleosa tanto na temperatura ambiente com

o teor de $79,89 \pm 4,54$, quanto ao ser armazenado na geladeira com o conteúdo remanescente de $83,36 \pm 2,38$. Isso pode ter ocorrido devido a falta de água na formulação controle, uma vez que as reações de degradação ocorrem principalmente em meio aquoso (MATTER *et al.*, 2019). Mesmo com essa propriedade, vale ressaltar que a emulsão conseguiu proteger em parte o fármaco do ambiente aquoso pois a sua formulação apresentava 90% composta de água e ainda assim conseguiu manter uma estabilidade similar ao controle na temperatura de geladeira.

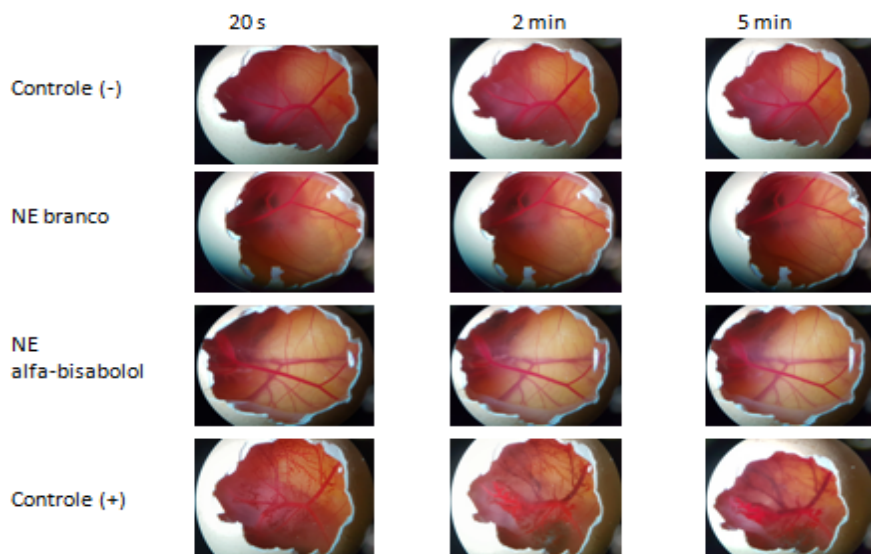
As nanopartículas também não obtiveram os resultados esperados, o conteúdo remanescente do alfa-bisabolol ficou bem menor do que as outras formulações. Com o passar do tempo, as nanopartículas podem sofrer alterações na sua estrutura, formando agregados que sedimentam com mais facilidade. Como não houve grandes diferenças no tamanho nem no pdi das partículas, a estabilidade física da formulação foi mantida, mas não houve a estabilização do princípio ativo pela composição. A capsula polimérica pode ter interagido com o fármaco e auxiliado na desestabilização da formulação. Para analisar melhor essa interação, pode ser considerado fazer outros testes, por exemplo ensaios de análise térmica.

5.6. ESTUDO DE IRRITABILIDADE *IN VITRO*

Dependendo de suas propriedades e concentrações, os tensoativos têm a característica de serem irritantes para o organismo. Os tensoativos não-iônicos são os mais indicados para serem utilizados devido à sua menor irritabilidade (SOUSA *et al.*, 2017). Diversos estudos utilizaram nanoemulsões para incorporar um fármaco por via tópica e obtiveram resultados promissores, como por exemplo, nanoemulsões com óleo de farelo de arroz foram obtidas com uma mistura de oleato de sorbitano/PEG-30 como tensoativo (JAISWAL *et al.*, 2015) e não apresentaram irritabilidade no ensaio HET-CAM. Outro exemplo foi com o uso de tensoativos catiônicos (cloreto de cetiltrimetilamônio) e surfactantes não iônicos (oleth-20 e oleth-3) para estabilizar a quercetina (DARIO *et al.*, 2016).

Neste trabalho, o Kolliphor[®] ELP e o Span[®]80 foram selecionados por serem não-iônicos. Além disso, foi utilizado baixas concentrações de tensoativos, o que possibilita diminuir potenciais efeitos tóxicos e/ou irritantes. No entanto, o pH das formulações foi ácido, o que poderia gerar alguma irritação para a pele. Desta forma, foram realizados ensaios HET-CAM para verificar o potencial irritativo da nanoformulação e os resultados estão mostrados na Figura 7.

Figura 7: Comparação entre formulações utilizadas na membrana corioalantóide após a aplicação das formulações. O controle negativo corresponde ao soro fisiológico 0,9% e o controle positivo é uma solução de NaOH 1 mol/L. Teste feito com a NE e NE α -b



Após a administração do controle negativo, não se observou nenhum evento hematológico durante os 5 min de observação e o controle foi classificado como não irritante. Já para o controle positivo, foram evidenciados hemorragia, hiperemia e coagulação/opacidade logo nos primeiros segundos de observação da CAM e a amostra foi classificada como irritante severa. As nanoemulsões se assemelharam ao controle negativo e foram, portanto, classificadas como não irritantes, mostrando-se adequadas para serem aplicadas pela via tópica.

A nanoemulsão possuía uma concentração de 9% de tensoativos em sua composição e ao entrar em contato com a pele lesionada tinha chance de ser tóxico, porém não mostrou nenhum sinal de irritação. Já as nanopartículas possuem em sua composição apenas 0,5% de tensoativos (concentração 18x menor que da nanoemulsão) e todos os outros componentes (água, alfa-bisabolol e o biopolímero) não são tóxicos para serem utilizados em formulações tópicas (JIA *et al.*, 2008). Dessa forma, não foi preciso fazer esse ensaio com as nanopartículas poliméricas.

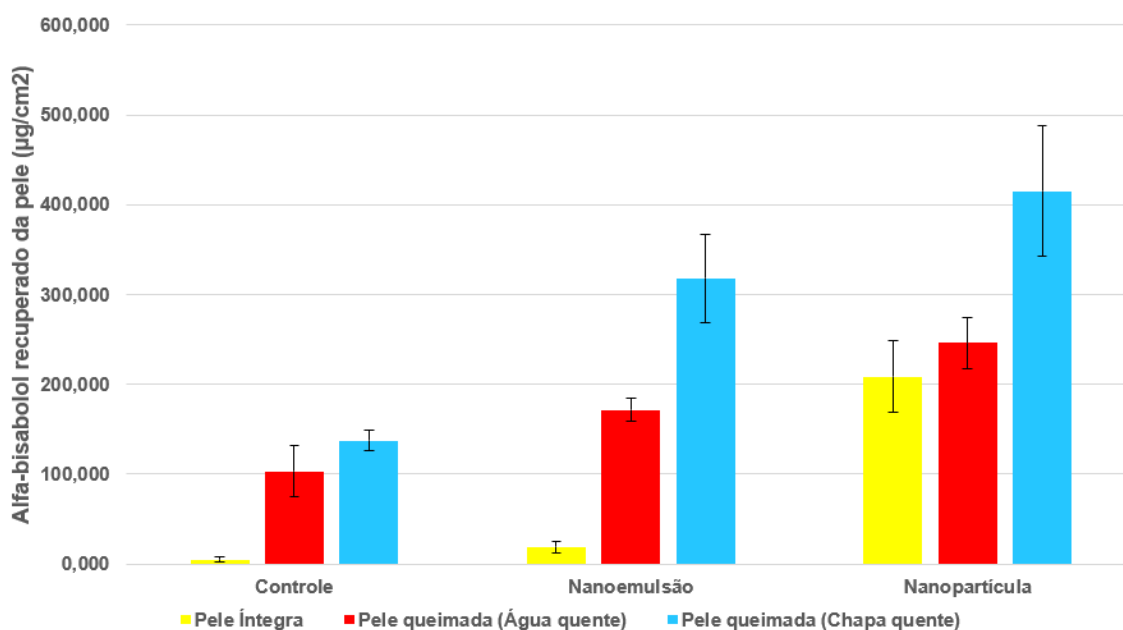
5.7. ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

O alfa-bisabolol possui características hidrofóbicas, o que o torna altamente capaz de atravessar as camadas da pele, principalmente o estrato córneo, até atingir camadas mais profundas. Neste estudo, as camadas da pele não foram separadas, pois a queimadura com placa danifica essa primeira barreira cutânea (PENCKLE *et al.*, 2020). No

entanto, mesmo com o estrato córneo danificado, não houve quantificação de alfa-bisabolol na solução receptora das células de difusão em nenhum dos experimentos de permeação cutânea *in vitro*.

A Figura 8 mostra a quantidade de alfa-bisabolol recuperado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dos modelos de pele (intacto, queimado com água quente e queimado com placa) após 12 h de tratamento com NE α -b, NP α -b e a solução controle oleosa.

Figura 8: Gráfico relacionando a quantidade de fármaco recuperado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após a permeação de 12h da NE α -b e NP α -b com o controle (1% alfa-bisabolol em óleo de girassol)



Na pele íntegra, a NE α -b aumentou a retenção cutânea do fármaco cerca de $\sim 3,7$ vezes ($p < 0,05$) e a NP α -b cerca de $\sim 40,9$ vezes ($p < 0,05$) em comparação com a solução controle oleosa. O mesmo ocorreu com a pele queimada com água quente e a pele queimada com a chapa quente. Na pele queimada com água quente, a penetração da droga foi $\sim 1,7$ vezes ($p < 0,05$) e $\sim 2,4$ vezes ($p < 0,05$) maior do que a solução controle, respectivamente. Enquanto isso, na pele queimada com placa, a NE α -b aumentou a penetração cutânea do alfa-bisabolol em cerca de 2,3 vezes ($p < 0,05$) e a NP α -b por volta de $\sim 3,0$ vezes ($p < 0,05$) em comparação com a solução controle.

Evidentemente, a NE α -b e a NP α -b têm um efeito pronunciado na penetração e acumulação do alfa-bisabolol. De fato, os surfactantes presentes nas nanoemulsões são capazes de interagir com os lipídios presentes na pele e promover uma desestabilização das camadas da pele (FERREIRA-NUNES *et al.*, 2018). Outro ponto a ser citado é a

organização estrutural das nanogotículas que oferecem uma maior superfície de contato com os tecidos adjacentes, otimizando sua penetração (WANG *et al.*, 2008).

Além disso, no caso da NP α -b, é possível observar uma diferença significativa na sua permeação na pele íntegra em relação as outras duas formulações. Alguns estudos apresentam a capacidade de nanossistemas se acumularem nos folículos pilosos formando um depósito do fármaco no local (LADEMANN *et al.*, 2015, USHIROBIRA *et al.*, 2020) Assim, durante o experimento o alfa-bisabolol se concentrou na região e a sua permeação para dentro da pele foi acelerada.

O alfa-bisabolol possui propriedades físico-químicas que o tornam capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele. Sabe-se que os terpenos dos óleos essenciais extraídos das plantas atuam como promotores da absorção de fármacos (AQIL *et al.*, 2007, HERMAN, HERMAN 2015). Kadir e Barry (1991) demonstraram que o alfa-bisabolol foi capaz de aumentar a penetração do 5-fluorouracil em cerca de 17 vezes na pele suína e cerca de 73 vezes mais a quantidade de acetinado de triancinolona (KADIR, BARRY, 1991). Além disso, o alfa-bisabolol demonstrou o mesmo efeito do etanol como promotor da absorção percutânea do succinato de sumatriptata (FEMENÍA-FONT *et al.*, 2005)

Em comparação com os modelos de pele usados, uma quantidade maior de alfa-bisabolol foi encontrada na pele queimada com placa quente pela nanoemulsão e pela nanopartícula em comparação com a pele normal. Na pele queimada com chapa quente, a NE α -b aumentou cerca de $\sim 16,7$ vezes ($p < 0,05$) e a NP α -b aumentou cerca de ~ 2 vezes ($p < 0,05$). Em relação à pele queimada com água quente, NE α -b aumentou a penetração em cerca de ~ 9 vezes e a NP α -b aumentou cerca de $\sim 1,2$ vezes em relação à pele intacta ($p < 0,05$) (Figura 8).

O estrato córneo representa a primeira barreira contra a penetração de substâncias de agentes externos (NIELSEN *et al.*, 2016). Com o processo de queima, essa camada é danificada e assim favorece a entrada de substâncias ou microorganismos (BEHL *et al.*, 1980). É possível observar que nas peles queimadas o alfa-bisabolol conseguiu penetrar mais no tecido, esse resultado já era esperado uma vez que a pele danificada perde sua estrutura. No estudo de Filon, as nanopartículas de cobalto apresentaram quase o dobro da penetração na pele danificada em comparação com a pele intacta (LARESE FILON *et al.*, 2013).

Além disso, com esse teste é possível concluir que em termos de penetração, as 2 formulações favoreceram a penetração do fármaco em todos os estados da pele (CONTRI *et al.*, 2011), principalmente nas peles queimadas. Diferente do encontrado em outros artigos (EZEALISIJ, OKORIE, 2018, LARESE FILON *et al.*, 2013), mesmo com essa desestruturação, não houve permeação cutânea em nenhuma formulação, independente da queimadura. Assim, são necessários mais estudos sobre a permeação das

nanopartículas pois em diferentes condições como tipos de lesões, feridas ou áreas flexíveis da pele as nanopartículas podem alterar sua permeação (CROSERÁ et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

As nanoformulações desenvolvidas parecem ser sistemas promissores como tratamento dermatológico para queimaduras. As suas características físico-químicas são adequadas para a sua administração tópica, e ambos os sistemas aumentaram a penetração do fármaco na pele, principalmente quando sua camada mais externa, o estrato córneo, está danificado com queimaduras. No entanto, quando se avalia a estabilidade, verificou-se que as nanoemulsões preservaram melhor a estabilização do fármaco que as nanopartículas poliméricas, mostrando ser um sistema mais promissor para viabilizar a administração tópica do princípio ativo.

7. REFERÊNCIAS

- AGENCY, E. M. "European Medicines Agency: An unacceptable choice", **Prescrire International**, v. 20, n. 121, p. 278, 2011.
- ALAN ANDERSEN, F. "Final report on the safety assessment of Bisabolol", **International Journal of Toxicology**, v. 18, n. SUPPL. 3, p. 33–40, 1999.
- ALI, S. M., YOSIPOVITCH, G. "Skin pH: From basic science to basic skin care", **Acta Dermato-Venereologica**, v. 93, n. 3, p. 261–267, 2013.
- ALMEIDA, E.A.T., FERREIRA-NUNES, R., GELFUSO, G.M., "Aqueous-Based Nanoemulsion Containing (-)- α -Bisabolol for Topical Treatment of Skin burns", **Current Cosmetic Science**, v. 1, 2021
- ANGELO, T., EL-SAYED, N., JURISIC, M., *et al.* "Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded Lipid Nanocarriers", **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- AQIL, M., AHAD, A., SULTANA, Y., *et al.* "Status of terpenes as skin penetration enhancers", **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1061–1067, 2007.
- ASSIS, L., ZAVAREZE, E. da R., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C., *et al.* "Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods", **Brazilian Journal of Food Technol**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012. .
- BADRI, W., MILADI, K., ROBIN, S., *et al.* "Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study", **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 9, p. 1773–1783, 2017.
- BANDO, H., MOHRI, S., YAMASHITA, F., *et al.* "Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 6, p. 759–761, 1997.
- BARRADAS, T. N., DE HOLANDA E SILVA, K. G. "Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review", **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 1153–1171, 2021.
- BEHL, C. R., FLYNN, G. L., KURIHARA, T., *et al.* **Permeability of thermally damaged skin: I. Immediate influences of 60°C scalding on hairless mouse skin.** **Journal of Investigative Dermatology**. [S.l: s.n.]. , 1980.
- BEZERRA, S. B. "Atividade Gastroprotetora E Antimicrobiana (Camomila) E Do Alfa-Bisabolol: Possíveis", p. 114, 2009.
- BHATIA, S. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., *et al.* "Fragrance material review on α -bisabolol", **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 SUPPL., p. 72–76, 2008.
- BOLGIANI, A. N., SERRA, M. C. "Atualização no tratamento local das queimaduras ", **Rev Bras Queimadura**, v. 9, n. 2, p. 37–44, 2010.
- BRASIL. "RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017,", **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- Brown TM, Krishnamurthy K. Histology, Dermis. [Updated 2021 May 10]. In: **StatPearls**

[Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls** Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/> accessed on October 14th

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

CHAU, C. F., WU, S. H., YEN, G. C. "The development of regulations for food nanotechnology", **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 269–280, 2007.

CHEONG, J. N., TAN, C. P., MAN, Y. B. C., *et al.* " α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation", **Journal of Food Engineering**, v. 89, n. 2, p. 204–209, 2008.

CONTRI, R. V., FIEL, L. A., POHLMANN, A. R., *et al.* "Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and in Vitro Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration", **Nanocosmetics and Nanomedicines**, p. 3–35, 2011.

CORRÊA, M. A. **COSMETOLOGIA Ciência e Técnica**. 1a ed. [s.l.] Editora Medfarma, 2012.

COUVREUR, P., BARRAT, G., FATTAL, E., *et al.* "Nanocapsule Technology: A Review", **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, V.19, n.2, p. 99-134, 2002.

CROSERÀ, M., BOVENZI, M., MAINA, G., *et al.* "Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature", **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, n. 9, p. 1043–1055, 2009.

D'ALMEIDA, A. P. L., PACHECO DE OLIVEIRA, M. T., DE SOUZA, É. T., *et al.* "A-Bisabolol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules Reduce Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Inflammation in Mice", **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4479–4491, 2017.

DARIO, M. F., OLIVEIRA, C. A., CORDEIRO, L. R. G., *et al.* "Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion: In vitro and in vivo assessments", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 591–599, 2016.

DOH, H. J., JUNG, Y., BALAKRISHNAN, P., *et al.* "A novel lipid nanoemulsion system for improved permeation of granisetron", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 475–480, 2013.

EZEALISIJ, K. M., OKORIE, H. N. "Size-dependent skin penetration of silver nanoparticles: effect of penetration enhancers", **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 8, n. 8, p. 2039–2046, 2018.

FEMENÍA-FONT, A., BALAGUER-FERNÁNDEZ, C., MERINO, V., *et al.* "Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, n. 1–2, p. 50–55, 2005.

FERREIRA-NUNES, R., ANGELO, T., DA SILVA, S. M. M., *et al.* "Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts", **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 2, p. 1–8, 2018.

FERREIRA-NUNES, R., SILVA, S. M. M. da, SOUZA, P. E. N. de, *et al.* "Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation", **Journal of Molecular Liquids**, v. 265, n. 2017,

p. 408–415, 2018.

FERREIRA, F. V., PAULA, L. B. "Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos : estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras", **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 132–139, 2013.

GAWRYSZEWSKI, V. P., IVATA BERNAL, R. T., DA SILVA, N. N., *et al.* "Atendimentos decorrentes de queimaduras em serviços públicos de emergência no Brasil, 2009", **Cadernos de Saude Publica**, v. 28, n. 4, p. 629–640, 2012.

GUTERRES, S. S., ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. "Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications", **Drug Target Insights**, v. 2, p. 117739280700200, 2007.

Harmonised Tripartite Guideline – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1). International Conference on Harmonization, Geneva, 2005

HE, W., LU, Y., QI, J., *et al.* "Nanoemulsion-templated shell-crosslinked nanocapsules as drug delivery systems", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 445, n. 1–2, p. 69–78, 2013.

HERMAN, A., HERMAN, A. P. "Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 473–485, 2015.

HONG, I. K., KIM, S. I., LEE, S. B. "Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index", **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 67, p. 123–131, 2018.

HOSSEINI, S. F., ZANDI, M., REZAEI, M., *et al.* "Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study", **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

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

JIA, W. J., GU, Y. C., GOU, M., *et al.* "Preparation of biodegradable polycaprolactone/poly (ethylene glycol)/polycaprolactone (PCEC) nanoparticles", **Drug Delivery**, v. 15, n. 7, p. 409–416, 2008

JÚNIOR, E. M. L., DE MORAES FILHO, M. O., COSTA, B. A., *et al.* "Innovative burn treatment using tilapia skin as a xenograft: A phase II randomized controlled trial", **Journal of Burn Care and Research**, v. 41, n. 3, p. 585–592, 2020.

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

KADIR, R., BARRY, B. W. " α -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 70, n. 1–2, p. 87–94, 1991.

KONEVA, A. S., SAFONOVA, E. A., KONDRAKHINA, P. S., *et al.* "Effect of water content on structural and phase behavior of water-in-oil (n-decane) microemulsion system stabilized by mixed nonionic surfactants SPAN 80/TWEEN 80", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 518, p. 273–282, 2017.

LACERDA LA, CARNEIRO AC, OLOIVEIRA AF, GRAGMANI, F. L. "Estudo epidemiológico da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo", **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 82–88, 2010.

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

LAMBERS, H., PIESENS, S., BLOEM, A., *et al.* "Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora", **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 5, p. 359–370, 2006.

LARESE FILON, F., CROSER, M., TIMEUS, E., *et al.* "Human skin penetration of cobalt nanoparticles through intact and damaged skin", **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 121–127, 2013

LEITE, G. de O., FERNANDES, C. N., DE MENEZES, I. R. A., *et al.* "Attenuation of visceral nociception by α -bisabolol in mice: investigation of mechanisms", **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 1, p. 6–10, 2012

LIMA-JUNIOR, E. M., PICOLLO, N. S., MIRANDA, M. J. B. de, *et al.* "Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo , no tratamento de queimaduras The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing , in the treatment of burn wounds El uso de piel de tilapia", **Rev Bras Queimaduras.**, v. 16, n. 1, p. 10–17, 2017.

LÓPEZ-CABEZA, R., KAH, M., GRILLO, R., *et al.* "Is centrifugal ultrafiltration a robust method for determining encapsulation efficiency of pesticide nanoformulations?", **Nanoscale**, v. 13, n. 10, p. 5410–5418, 2021.

LUEPKE, N. P., KEMPER, F. H. "The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test", **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6–7, p. 495–496, 1986.

MASMOUDI, H., DRÉAU, Y. Le, PICCERELLE, P., *et al.* "The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1–2, p. 117–131, 2005.

MATTER, B., GHAFARI, A., BOURNE, D., *et al.* "Dexamethasone Degradation in Aqueous Medium and Implications for Correction of In Vitro Release from Sustained Release Delivery Systems", **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 8, 2019.

MEDA VENDRUSCULO, T., BALDIN BALIEIRO, C. R., ECHEVARRÍA GUANILO, M. E., *et al.* "Queimaduras en ambiente doméstico : características y circunstancias del accidente", **Revista Latino-Am. Enfermagem**, v. 18, n. 3, p. 160–169, 2010.

MEHNERT, W., MÄDER, K. "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications", **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 83–101, 2012.

MITSUNAGA JR, J. K., GRAGNANI, A., RAMOS, M. L. C., *et al.* "Rat an experimental model for burns. A systematic review", **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 417–423, 2012.

MOHANRAJ, V. J., CHEN, Y. "Nanoparticles - A review", **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2007.

MONTES, S. F., BARBOSA, M. H., NETO, A. L. de S. "Clinical and epidemiological aspects of burned patients hospitalized in a teaching hospital", **Revista da Escola de Enfermagem**,

v. 45, n. 2, p. 365–369, 2011.

MORIMOTO, Yasunori et al. Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 44, n. 8, p. 634–639, 1992.

NEGUT, I., GRUMEZESCU, V., GRUMEZESCU, A. M. "Treatment strategies for infected wounds", **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–23, 2018.

NIELSEN, J. B., BENFELDT, E., HOLMGAARD, R. "Penetration through the Skin Barrier", **Current Problems in Dermatology (Switzerland)**, v. 49, p. 103–111, 2016.

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

OLIVEIRA, E. C. V., BOOCK, K. P., MARUNO, M., *et al.* "Accelerated stability and moisturizing capacity of emulsions presenting lamellar gel phase obtained from Brazilian natural raw material", **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 1135–1139, 2011.

Pencle FJ, Mowery ML, Zulfiqar H. First Degree Burn. [Updated 2021 Aug 13]. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-**. accessed on October 14th

PERBELLINI, L., GOTTARDO, R., CAPRINI, A., *et al.* "Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods", **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 373–377, 2004.

PEREIRA JÚNIOR, José Lopes. ESTUDO DOS EFEITOS DO ALFA-BISABOLOL NA MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS. 2018.

PIRES, F. Q., DA SILVA, J. K. R., SA-BARRETO, L. L., *et al.* "Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. April, p. 110382, 2019.

RAO, J. P., GECKELER, K. E. "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters", **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

REGITANO NETO, A., MIGUEL, A. M. R. de O., MOURAD, A. L., *et al.* "Environmental effect on sunflower oil quality", **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 197–204, 2016.

ROLAND, I., PIEL, G., DELATTRE, L., *et al.* "Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

ROOSTERMAN, D., GOERGE, T., SCHNEIDER, S. W., *et al.* "Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ", **Physiological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 1309–1379, 2006.

SANTOS JUNIOR, R. A., SILVA, R. L. M., LIMA, G. L., *et al.* "Perfil epidemiológico dos pacientes queimados no Hospital de Urgências de Sergipe TT - Epidemiological profile of

burned patients at the Emergency Hospital of Sergipe TT - Perfil epidemiológico de los pacientes con quemaduras en el Hospital de Emergenci", **Rev. bras. queimaduras**, v. 15, n. 4, p. 251–255, 2016.

SAQIB, M., SHABBIR ALI BHATTI, A., AHMAD, N. M., *et al.* "Amphotericin b loaded polymeric nanoparticles for treatment of leishmania infections", **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, 2020.

SERVICES, H. "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry", n. July, 2015. .

SILVA, A. P., MARTINI, M. V., DE OLIVEIRA, C. M. A., *et al.* "Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines", **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2987–2993, 2010.

SILVA, R. L. M., JUNIOR, R. A. dos S., LIMA, G. L., *et al.* "Características epidemiológicas das crianças vítimas de queimaduras atendidas no Hospital de Urgências de Sergipe Profil of children of burn injuries in children admitten to the Emergency Hospital of Sergipe Características epidemiológicas de niños víctim", **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 15, n. 3, p. 158–163, 2016.

SOUSA, G. D., KISHISHITA, J., AQUINO, K. A. S., *et al.* "Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from *Syagrus cearensis* for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative Methods", **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1833–1842, 2017.

SOUZA, L. R. P., LIMA, M. F. A. B., DIAS, R. O., *et al.* "O tratamento de queimaduras: uma revisão bibliográfica / The burn treatment: a bibliographic review", **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37061–37074, 2021.

STAMATAS, G. N., NIKOLOVSKI, J., MACK, M. C., *et al.* "Infant skin physiology and development during the first years of life: A review of recent findings based on in vivo studies", **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 1, p. 17–24, 2011.

TAKAKU, Y., SUZUKI, H., OHTA, I., *et al.* "A 'NanoSuit' surface shield successfully protects organisms in high vacuum: Observations on living organisms in an FE-SEM", **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1802, 2015.

TOMIČ, M., POPOVIČ, V., PETROVIČ, S., *et al.* "Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation", **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 759–766, 2014.

TORTORA, G. J., DERRICKSON, B., **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 14. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

USHIROBIRA, C. Y., AFIUNE, L. A. F., PEREIRA, M. N., *et al.* "Dutasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 56–61, 2020.

VILA, R., SANTANA, A. I., PÉREZ-ROSÉS, R., *et al.* "Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol", **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2510–2514, 2010.

VINARDELL, M. P., MACIÁN, M. "Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential", **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 467–470,

1994.

WANG, J. J., HUNG, C. F., YEH, C. H., *et al.* "The release and analgesic activities of morphine and its ester prodrug, morphine propionate, formulated by water-in-oil nanoemulsions", **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 4, p. 294–301, 2008

ZANETTI, M., MAZON, L. R., DE MENESES, A. C., *et al.* "Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles", **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 198–207, 2019.

ZDRALI, E., CHEN, Y., OKUR, H. I., *et al.* "The Molecular Mechanism of Nanodroplet Stability", **ACS Nano**, v. 11, n. 12, p. 12111–12120, 2017.