



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICRO E
NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DILAPIOL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Piper aduncum* DA AMAZÔNIA

SIMONE BRAGA CARNEIRO

MANAUS/AM
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

SIMONE BRAGA CARNEIRO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICRO E
NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DILAPIOL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Piper aduncum* DA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Letícia Scherer Koester

MANAUS/AM
2020

**“Desenvolvimento Tecnológico de Micro e Nanoformulações contendo
Dilapiol do óleo essencial de *Piper aduncum* da Amazônia”.**

DISCENTE: SIMONE BRAGA CARNEIRO

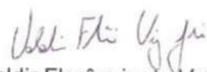
PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

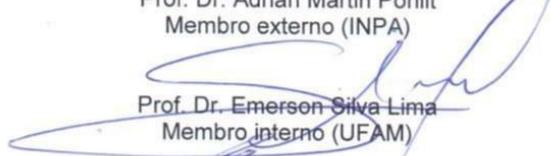
Manaus - AM, 27/02/2020.

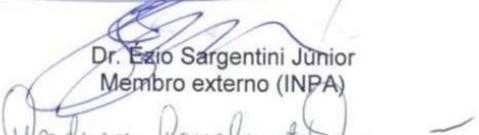

Prof. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Coordenadora do PPGIF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**


Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Orientador e presidente da banca


Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Membro externo (INPA)


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro interno (UFAM)


Dr. Ezio Sargentini Junior
Membro externo (INPA)


Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Membro interno (UFAM)

FICHA CATALOGRÁFICA

C289n Carneiro, Simone Braga
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICRO E
NANOFORMULAÇÕES CONTENDO DILAPIOL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE Piper aduncum DA AMAZÔNIA / Simone Braga
Carneiro . 2020
119 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientadora: Leticia Scherer Koester
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Óleos essenciais. 2. Amazônia. 3. Ciclodextrinas. 4.
Nanoformulação. 5. Tecnologia farmacêutica. I. Veiga Júnior, Valdir
Florêncio da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RESUMO

Diversos recursos da flora amazônica são conhecidos por seu potencial aromático e farmacológico e cosmético. A família botânica Piperaceae da Amazônia possuem destaque devido às atividades biológicas e à produção de óleos essenciais aromáticos, como a espécie *Piper aduncum* rica em dilapiol que é ativo para diversas atividades farmacológicas como antibacteriano, antifúngico e anti-inflamatório. Os óleos essenciais por serem lipofílicos e hidrofóbicos, apresentam limitações como alta volatilidade, baixa estabilidade, biodisponibilidade e solubilidade que desencadeia no menor aproveitamento desses insumos para a indústria farmacêutica e cosmética. O fenilpropanóide Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*, que apresenta grande potencial farmacêutico, na qual foram feitas complexações com ciclodextrinas (CDs), microemulsões, nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados que são alternativas tecnológicas convenientes para resolver essas limitações, podendo proporcionar derivados mais solúveis, estáveis, maior biodisponibilidade e tempo de retenção de substâncias ativas. Este trabalho tem como objetivo analisar diferentes metodologias de incorporação do Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* da Amazônia em tecnologias farmacêuticas como nanoformulações, microemulsões e complexo de inclusão com ciclodextrinas, a fim de obter produtos inovadores viáveis para uso farmacêutico e cosmético. Os óleos foram obtidos pela técnica de hidrodestilação e por arraste à vapor em extrator elétrico. Em seguida, os principais constituintes foram fracionados e isolados por técnicas cromatográficas e analisadas por técnicas espectrométricas. Os complexos de inclusão foram feitos com β -ciclodextrina e Hidroxipropil- β -ciclodextrina pelos métodos de mistura física, malaxagem e slurry. As microemulsões foram feitas pelo diagrama de fases pseudoternário, a nanoemulsão e o carreador lipídico nanoestruturado foram realizadas pela técnica de homogeneização a alta pressão e feito também seus espessamentos em hidrogéis. Foram realizadas em todas as formulações as análises físico-químicas. Nas nanos foram avaliadas a liberação das substâncias e permeação tópica e o perfil de toxicidade. As atividades antibacteriana e moduladora de antibióticos foram feitas na microemulsão e nos complexos de inclusão. As microemulsões apresentaram tamanho em 123 nm nas formulações com 10% de dilapiol. A atividade antimicrobiana e moduladora com os complexos e microemulsão apresentaram modulação dos antibióticos ampicilina e vancomicina para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A liberação e permeação tópica das nanos e hidrogéis que apresentaram tamanho nanométrico na faixa de 118 e 134 nm, apresentaram perfis de liberação controladas em comparação com a substância pura e os níveis de toxicidade baixos. As micros e nanotecnologias nos bioativos de óleos essenciais da Amazônia permitem uma maior exploração farmacológica e cosmética dessas fontes naturais, aumentando seu potencial econômico, maior conhecimento da biodiversidade amazônica e elaboração de novo bioproduto farmacológico de alta eficiência.

Palavras-chave: Óleos essenciais, Amazônia, Bioativos, Formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Several resources of the Amazonian flora are known for their aromatic, pharmacological and cosmetic potential. The Amazonian Piperaceae botanical family stands out due to biological activities and the production of aromatic essential oils, such as the *Piper aduncum* species rich in dillapiole which is active for several pharmacological activities such as antibacterial, antifungal and anti-inflammatory. Essential oils, because they are lipophilic and hydrophobic, have limitations such as high volatility, low stability, bioavailability and solubility that triggers less use of these inputs for the pharmaceutical and cosmetic industry. The phenylpropanoid dillapiole of the essential oil of *P. aduncum*, which has great pharmaceutical potential, in which complexations were made with cyclodextrins (CDs), microemulsions, nanoemulsions and nanostructured lipid carriers that are convenient technological alternatives to solve these limitations, and may provide more soluble derivatives, stable, greater bioavailability and retention time of active substances. This work aims to analyze different methodologies for incorporating dillapiole from the essential oil of *P. aduncum* from the Amazon into pharmaceutical technologies such as nanoformulations, microemulsions and inclusion complex with cyclodextrins, in order to obtain viable innovative products for pharmaceutical and cosmetic use. The oils were obtained by the hydrodistillation technique and by steam dragging in an electric extractor. Then, the main constituents were fractionated and isolated by chromatographic techniques and analyzed by spectrometric techniques. The inclusion complexes were made with β -cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -cyclodextrin by physical mixing, malaxagem and slurry methods. The microemulsions were made by the pseudoternary phase diagram, the nanoemulsion and the nanostructured lipid carrier were carried out using the high pressure homogenization technique and also thickened them in hydrogels. Physical-chemical analyzes were performed in all formulations. In the nanos, the release of substances and topical permeation and the toxicity profile were evaluated. The antibacterial and antibiotic modulating activities were performed on the microemulsion and inclusion complexes. The microemulsions were 167 nm in size with 10% dillapiole. The antimicrobial and modulating activity with the complexes and microemulsion showed modulation of the antibiotics ampicillin and vancomycin for the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. The release and topical permeation of the nanos and hydrogels that presented nanometric sizes in the range of 118 and 134 nm, presented controlled release profiles in comparison with the pure substance and the low toxicity levels. The micro and nanotechnologies in bioactive essential oils from the Amazon allow greater pharmacological and cosmetic exploration of these natural sources, increasing their economic potential, greater knowledge of Amazonian biodiversity and the elaboration of a new highly efficient pharmacological bioproduct.

Keywords: Essential oils, Amazon, Bioactive, Pharmaceutical formulations.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

Dedico esta tese ao meu amado, incrível e exemplar pai Francisco das Chagas Portela Carneiro (in memoriam) por todo seu amor, companheirismo e por todos os esforços que fizeste para o meu desenvolvimento. Obrigada por tudo pai!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por tantas bênçãos e milagres concedidos. A todas as oportunidades que tive de crescer como pessoa e da força nos momentos mais difíceis, sempre demonstrando sinais de seu infinito amor e de suas orientações, confortando meu coração e colocando na minha vida pessoas que fazem a diferença.

A minha amada mãe **Maria de Jesus Braga da Costa** e meu amado pai **Francisco das Chagas Portela Carneiro** por todo o exemplo, carinho e muito amor destinados a mim. Eles que abriram mão da minha companhia em prol da minha educação, sempre estiveram presente em minha vida, obrigada por terem me dado uma base de educação, caráter e amor e por terem me acompanhado e cuidado de mim em todos meus níveis de crescimento. Certamente não seria possível sem a ajuda de vocês chegar até aqui! Dedico a eles todas as vitórias conquistadas ao longo dos anos.

A minha amada irmã **Sarlyane Braga Carneiro** por ser sempre a minha amiga, companheira e ser um exemplo na minha vida.. Em outros estados fomos crescendo juntas e aprendendo juntas, passando por diversas aventuras e receios. Esse doutorado não só proporcionou meu crescimento, mas também colaborou muito para o crescimento da minha irmã, que se desenvolveu muito também no nível profissional e pessoal. Obrigada por todo amor e por toda companhia minha irmã!

Ao meu amado e querido **Rafael Pegado da Silva** por todo amor, companheirismo, dedicação, grande ajuda e incentivo para conquista de objetivos e propósitos.

Ao professor **Valdir Florêncio da Veiga Júnior** pelo carinho, por ser meu exemplo de dedicação nos trabalhos, pelo acolhimento, confiança, ensinamentos e incentivo nos momentos em que é tão difícil conseguir ver os motivos que nos levam a trajetória de um caminho, principalmente quando pensamos que não temos mais força para percorre-lo. Nunca desistiu de mim, sempre com seus valorosos conselhos, disponibilizou todos os recursos e fez todos os esforços para desenvolvimento desta tese. Obrigada professor por ser um excelente orientador que tanto me ajudou a crescer tanto a nível profissional e pessoal.

Ao **grupo de pesquisa Q-Bioma** como um todo, a todos os membros. Aprendi muito, fiz excelentes amizades nesse grupo e me desenvolvi bastante. Às minhas queridas e amadas amigas e amigos por tudo que vivemos e aprendemos no Q-Bioma: Glaucia Manço, Milena Campelo, Emily Marcele, Steve Manickchand, Renata Duarte, Karen Maciel, Karen Castelo, Ananda Antonio, Larissa Silva, Isadora Moita, Yasmin Cunha, Klenicy Yamaguchi, Davi Oliveira, Nathalia Lamenha, Renan Libório, Leandro Lima.

A minha co-orientadora **Letícia Scherer Koester** por todo acolhimento, ensinamentos, carinho, conselhos e excelente orientação e a grande ajuda que me deste nesta trajetória do doutoramento. Sempre se preocupou em saber como eu estava vivendo pelo Rio Grande do Sul e como estava meu desenvolvimento nos projetos na UFRGS. Fez todos os esforços para me ver bem, me deu todas as condições pra conseguir passar bastantes horas essenciais no laboratório, como todos os materiais para trabalhar, alimentação no RU e entrada na UFRGS por ter conseguido pra mim a carteira da universidade como aluna especial. E me integrou muito bem nos laboratórios no qual eu desenvolvi os experimentais. Aprendi muito! És meu exemplo de mulher na ciência e pesquisa!

A minha amiga querida **Tainá Kreutz** que me ensinou e me acompanhou em todos meus experimentais na UFRGS, Tainá é mais uma inspiração de mulher na ciência e pesquisa, muito inteligente, cuidou muito bem de mim, me ajudou muito em todos meus experimentais e nos meses que passei na UFRGS, sempre cuidadosa e de bom humor, um exemplo. Você é muito valiosa minha amiga e muito especial! Obrigada por tudo!

Agradeço a todos do **laboratório de desenvolvimento galênico** e também agradeço a todos do **laboratório de toxicologia** da UFRGS, todos muito receptivos, atenciosos e dedicados, tive ótimos aprendizados e excelentes amizades inesquecíveis.

Agradeço a minha querida amiga **Janet Olbrisch** por todo acolhimento e por todas as estadias durante os meses que passei em Porto Alegre- RS. Muito obrigada pela imensurável ajuda, amizade, dedicação e apoio. Agradeço também a **Elaine Liechti** por toda amizade e apoio.

Ao professor **Ádley Antonini Neves de Lima** por todo acolhimento na UFRN e na INOFARM (Inovação em fármacos e medicamentos), agradeço as orientações e disponibilidades de recursos no desenvolvimento das etapas do doutoramento. De todas as orientações eu sempre levo grandes aprendizados e crescimentos. Muito obrigada por todo o aprendizado no decorrer desses anos.

Ao professor **Alcides de Oliveira Wanderley Neto** e **laboratório de tecnologia de tensoativos** no instituto de química da UFRN por todos os ensinamentos, ajudas e materiais disponibilizados para a elaboração das microemulsões.

Agradeço a minha querida e amada amiga **Thalita Sévia Soares de Almeida**, professor **José Cezário de Almeida** e família, por todo acolhimento e toda imensa ajuda nas estadias e no laboratório da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cajazeiras-Paraíba para os experimentais dos antibacterianos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Distribuição geográfica da família Piperaceae.....	24
Figura 02. Principais fenilpropanóides do óleo essencial de Piperaceae.....	28
Figura 03. Principais terpenóides descritos nos óleos essenciais de espécies de Piperaceae da Amazônia.....	30
Figura 04. Terpenóides descritos nos óleos essenciais de espécies de Piperaceae da Amazônia.....	31
Figura 05. Etapas do projeto de doutorado.....	42
Figura 06. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	60
Figura 07. Diagrama de fase pseudoternar para o sistema PEG-8, dilapiol do óleo de <i>P. aduncum</i> e água.....	62
Figura 08. Efeito modulador do dilapiol inserido em microemulsão em associação com antibióticos.....	66
Figura 09. Espectros de FTIR do Dilapiol do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e complexos de inclusão com ciclodextrinas.....	68
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura.....	70
Figura 11. Análise cristalográfica por raios X (DR-X).....	71
Figura 12. Termogravimetria dos complexos de inclusão de β -CD com dilapiol.....	72
Figura 13. Termogravimetria dos complexos de inclusão de HP- β -CD com dilapiol.....	72
Figura 14. Curvas de DSC dos complexos de inclusão do dilapiol de óleo essencial de <i>P. aduncum</i> com β -ciclodextrina.....	74
Figura 15. Curvas de DSC dos complexos de inclusão do dilapiol de óleo essencial de <i>P. aduncum</i> com HP- β -ciclodextrina.....	74
Figura 16. Efeito modulador do Dilapiol do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e seus complexos de inclusão com β -CD e HP- β -CD com o antibiótico ampicilina para a bactéria <i>S. aureus</i>	76
Figura 17. Efeito modulador do dilapiol e seus complexos de inclusão com β -CD e HP- β -CD com o antibiótico vancomicina para a bactéria <i>S. aureus</i>	77
Figura 18. Efeito modulador do dilapiol e seus complexos de inclusão com β -CD e HP- β -CD com o antibiótico ampicilina para a bactéria <i>E. faecalis</i>	77

Figura 19. Efeito modulador do dilapiol do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e seus complexos de inclusão com β -CD e HP- β -CD com o antibiótico vancomicina para a bactéria <i>E. faecalis</i>	78
Figura 20. Seletividade de fitas contendo estrato córneo suíno, epiderme, derme, fluido receptor e a solução de referência de EOPA com (1) dillapiole a 8,00 $\mu\text{g} / \text{mL}$	79
Figura 21. Resultados para tamanho de partícula (nm) (A), índice de polidispersividade (B) e potencial zeta (mV).....	83
Figura 22. Teor de dilapiol (%) das nanoformulações.....	84
Figura 23. Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão com ampliação.....	85
Figura 24. Reogramas com curvas ascendentes e descendentes das nanos em hidrogel....	86
Figura 25. Medições de bioadesão da força e trabalho de adesão.....	89
Figura 26. Perfil de liberação do dilapiol do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e das nanoformulações.....	91
Figura 27. Quantidade cumulativa permeada de dilapiol e das nanoformulações.....	92
Figura 28. Sequência de fotografias que ilustram os efeitos de diferentes substâncias aplicadas na membrana corioalantóica durante um período de 5 minutos.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Espécies aromáticas amazônicas da família Piperaceae.....	26
Tabela 02. Atividade biológica de espécies de Piperaceae na Amazônia.....	32
Tabela 03. Composição das formulações que contêm ou não o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> (% p / p).....	52
Tabela 04. Dados de extração do óleo essencial das folhas de <i>P. aduncum</i> por arraste a vapor no extrator elétrico.....	59
Tabela 05. Substâncias das folhas do óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	60
Tabela 06. Valores mínimos de concentração inibitória ($\mu\text{g/mL}^{-1}$).....	65
Tabela 07. Perdas de massa (%), faixas de temperatura de 25-200 °C, 200-400 °C e 400-600 °C.....	73
Tabela 08. Valores da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	75
Tabela 09. Resultados de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para dillapiole de diferentes matrizes.....	80
Tabela 10. Resultados para precisão intra-dia e inter-dia, exatidão e recuperação do dilapiol de diferentes matrizes.....	81
Tabela 11. Coeficientes de determinação (r^2) para modelos de fluxo reológico com base na taxa de cisalhamento e nas curvas de tensão de cisalhamento dos hidrogéis.....	87
Tabela 12. Classificação dos escores cumulativos no teste da membrana corioalantóica (HET-CAM) (n = 5).....	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 TECNOLOGIAS FARMACÊUTICAS EM MICRO E NANO APLICADA AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE Piperaceae DA AMAZÔNIA.....	22
3.1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE.....	24
3.1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE Piperaceae.....	26
3.1.4 POTENCIAL BIOATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE Piperaceae da AMAZÔNIA.....	31
3.1.5 INCLUSÃO DE ÓLEOS E ATIVOS DE Piperaceae EM TECNOLOGIAS FARMACÊUTICAS.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	44
4.1.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	44
4.1.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	44
4.1.4 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA AO DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS.....	44
4.1.5 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	44
4.2 MICROEMULSÃO COM DILAPIOL DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. aduncum</i>	45
4.2.1 MICROORGANISMOS.....	45
4.2.2 DROGAS.....	45
4.2.3 MICROEMULSÃO COM O DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO.....	45
4.2.4 DETERMINAÇÃO DO pH.....	46
4.2.5 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA.....	46
4.2.6 TAMANHO DA GOTA E POTENCIAL ZETA.....	46

4.2.7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E ATIVIDADE MODULADORA.....	46
4.3	COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS.....	47
4.3.1	COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	47
4.3.2	MISTURA FÍSICA (PM).....	47
4.3.3	MALAXAGEM (KND).....	47
4.3.4	SLURRY (SL).....	47
4.3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	48
4.3.6	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	48
4.3.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
4.3.8	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	48
4.3.9	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	48
4.3.10	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E ATIVIDADE MODULADORA.....	49
4.4	NANOFORMULAÇÕES COM DILAPIOL DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. aduncum</i>	49
4.4.1	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES.....	49
4.4.2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	49
4.4.3	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	50
4.4.4	MÉTODO DE VALIDAÇÃO.....	50
4.4.5	SELETIVIDADE.....	51
4.4.6	LINEARIDADE E LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO....	51
4.4.7	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	51
4.4.8	RECUPERAÇÃO.....	52
4.4.9	CARRY OVER.....	52
4.4.10	PREPERAÇÃO DE NANOEMULSÃO E CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO.....	53
4.4.11	PREPERAÇÃO DE HIDROGÉIS COM AS NANOFORMULAÇÕES...54	
4.4.12	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES E HIDROGÉIS.....	54

4.4.13 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DILAPIOL NOS HIDROGÉIS E NANOFORMULAÇÕES.....	55
4.4.14 TAMANHO DAS GOTÍCULAS, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA.....	55
4.4.15 MORFOLOGIA DAS NANOFORMULAÇÕES.....	55
4.4.16 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS HIDROGÉIS.....	56
4.4.17 MEDIÇÕES DE BIOADESÃO.....	56
4.4.18 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO.....	57
4.4.19 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO/RETENÇÃO EM PELE DE ORELHA SUÍNA....	57
4.4.20 TESTE DE TOXICIDADE (HET-CAM).....	59
4.4.21. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5. RESULTADOS.....	60
5.1 EXTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. aduncum</i>	60
5.2 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA AO DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	61
5.3 MICROEMULSÃO COM DILAPIOL DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. aduncum</i>	62
5.3.1 DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO.....	62
5.3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	64
5.3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	66
5.3.4 ATIVIDADE MODULADORA.....	66
5.4 COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO DILAPIOL COM CICLODEXTRINAS.....	68
5.4.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	68
5.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	70
5.4.3 ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA POR RAIOS-X.....	71
5.4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	72

5.4.5 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL.....	74
5.4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	76
5.4.7 ATIVIDADE MODULADORA.....	77
5.5 NANOFORMULAÇÕES COM DILAPIOL DO ÓLEO ESSENCIAL <i>P. aduncum</i>	79
5.5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES.....	82
5.5.2 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS HIDROGÉIS.....	86
5.5.3 MEDIÇÕES DE BIOADESÃO.....	89
5.5.4 LIBERAÇÃO DO DILAPIOL DAS NANOFORMULAÇÕES.....	90
5.5.5 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO.....	92
5.5.6 TOXICIDADE POR HET-CAM.....	95
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8. ANEXO 1.....	117
ANEXO 2.....	118

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca por ser um dos países com grande biodiversidade, contendo uma extensa e rica flora. A região Amazônica destaca-se pela riqueza em diversidade de espécies aromáticas e ocorrem principalmente na Amazônia. As espécies são produtoras de óleos essenciais que possuem substâncias com potencial biológico, agregando grande valor econômico para as comunidades da região Amazônica devido ao seu valor nos mercados alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, caracterizando a região por apresentar a maior diversidade de espécies com potencial biotecnológico do mundo (Bizzo et al., 2009; Maia et al., 2001).

Dentre as espécies Amazônicas, esta tese limita-se ao fenilpropanóide dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* da Amazônia, que apresenta grande potencial farmacêutico. *Piper aduncum* L. (Piperaceae) é popularmente conhecida como “pimenta de macaco”, é um arbusto tropical que cresce naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica do Brasil (Salehi et al., 2019; Silva et al., 2017). Seu óleo essencial é rico em dilapiol, um fenilpropanóide com propriedade fungicida (Silva et al., 2014), inseticida (Volpe et al., 2015), bactericida (Brazão et al., 2014), larvicida (Oliveira et al., 2013) e anti-inflamatório (Parise-filho et al., 2011), tendo relevância para a produção de bioprodutos.

O dilapiol por ser uma substância lipofílica tem sua eficácia limitada devido a sua baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade, além da alta volatilidade. Pode ser modificada por fatores ambientais como temperatura, pH e luminosidade (Bilia et al., 2014; Lima et al., 2016). Seu uso terapêutico depende da elaboração de formulações que possam reduzir essas limitações.

Para amenizar estes problemas, a complexação destes óleos essenciais com ciclodextrinas (CDs) pode ser uma alternativa conveniente. Além de abordar essas limitações, o uso de CDs pode fornecer uma maneira de obter materiais oleosos sólidos,

sendo um produto complexante, que pode resultar em derivados mais solúveis e estáveis. Características como taxa de dissolução e biodisponibilidade dependem da solubilidade do fármaco e, portanto, o aumento na solubilidade de um composto pouco solúvel tende a melhorar tanto a taxa de dissolução quanto sua biodisponibilidade (Marques, 2010; Lima et al., 2016; Carneiro et al., 2019).

A nanotecnologia que está relacionada às estruturas, propriedades e processos onde estão envolvidos materiais com dimensões em escala nanométrica, também podem atuar na redução desses problemas, dentre outros benefícios que esta tecnologia pode proporcionar. O processamento dos óleos essenciais em nanoformulações pode potencializar atividades biológicas, promover melhorias na estabilidade, na forma de administração das substâncias ativas com liberação gradual em doses favoráveis e diminuição dos efeitos colaterais. (Bilia et al., 2014; Matos et al., 2018).

Existem técnicas distintas para produção e avaliação dos diferentes nanosistemas que podem ser obtidos, tais como, as nanoemulsões que são dispersões de óleo em água, onde os tamanhos das gotas dispersas tem tamanho inferior a 1 μm . Quando parte do conteúdo oleoso líquido é substituído por um lipídio sólido, obtém-se um carreador lipídico nanoestruturado, com tamanho entre 50 nm e 1 μm (Lucca et al., 2017; Pardeike et al., 2009; Bilia et al., 2014; Salvi e Pawar, 2019).

Indústrias do ramo farmacêutico têm demonstrado interesse em desenvolver micro e nanoformulações destacando-a como diferencial do produto. A nanotecnologia tem sido utilizada para diferentes aplicações com possibilidade de criar produtos e processos baseados na crescente capacidade tecnológica de manipular moléculas. A oportunidade para inovar e empreender com a nanociência conduz a criação de mercados nanotecnológicos (Linton e Walsh, 2008; Alice et al., 2013)

Considerando o potencial bioativo do dilapiol de *P. aduncum* da Amazônia, seus estudos fitoquímicos aliados com as formulações farmacêuticas em micro e nanotecnologia

acarretarão em aumento da eficácia dos produtos, com largas aplicações biotecnológicas, sendo útil para o aproveitamento dessa matéria prima, com a perspectiva de melhor utilização das mesmas, agregando valor aos insumos aromáticos e seus bioprodutos.

2 - OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver nanoformulações, microemulsões, complexos de inclusão com ciclodextrinas para incorporação de dilapiol, extraído de *Piper aduncum*, a fim de obter produtos inovadores viáveis para uso farmacêutico.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter óleos essenciais e caracterizá-los por cromatografia em camada delgada (CCD), por cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (CG FID) e cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG EM);

- Isolar bioativos por técnicas de cromatografia em coluna de fase normal e determinar as estruturas químicas por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas (HPTLC, CG- DIC, CG-EM);

- Incorporar o dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* em nanoformulações como carreadores lipídicos nanoestruturados, nanoemulsões e espessamento dessas nanos em hidrogéis e caracterizar as propriedades físico-químicas;

‘ - Avaliar a estabilidade (acelerada e em longa duração) das nanos desenvolvidas;

- Investigar o perfil de permeação e penetração cutânea *in vitro* do Dilapiol a partir das nanos desenvolvidas, empregando-se o modelo de pele de orelha suína em células de difusão de Franz;

- Investigar o perfil de liberação do Dilapiol utilizando membranas em células de difusão de Franz;

- Realizar complexos de inclusão do dilapiol com a β -ciclodextrina e caracterizar as propriedades físicas, químicas e físico-químicas;

- Realizar microemulsões com dilapiol e caracterizar as propriedades físico-químicas;

- Avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora, toxicidade por HET CAM e atividade antioxidante das formulações desenvolvidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecnologias farmacêuticas em micro e nano aplicada aos óleos essenciais de Piperaceae da Amazônia

A família Piperaceae possui distribuição tropical, sendo representada por ervas, cipós, arbustos e raramente por árvores, incluídas em cinco gêneros com aproximadamente 2.000 espécies. *Piper* é o maior gênero da família e no Brasil está distribuído principalmente na Mata Atlântica e na região amazônica (Gogosz et al. 2012). As espécies da família Piperaceae são conhecidas pela grande produção de óleos essenciais, principalmente em suas folhas. Esses óleos aromáticos apresentam várias substâncias bioativas que têm sido cada vez mais exploradas. Caracterização química, atividades farmacológicas e biológicas dos óleos essenciais e compostos voláteis isolados, seguidas de outras modificações químicas por síntese, são algumas das pesquisas em andamento (Parise-Filho et al., 2011; Corral, 2014; Silva et al., 2014; Branquinho et al., 2017; Oliveira et al., 2019).

As espécies do gênero *Piper* apresentam alta produção de terpenos em seus óleos essenciais, importantes para as indústrias farmacêutica e cosmética, devido aos seus aromas e atividades biológicas. O sesquiterpeno β -cariofileno amplamente utilizado pelas indústrias química e farmacêutica por suas diversas atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas e analgésicas. Monoterpenos como linalol e eucaliptol com aplicações em perfumes e cosméticos. (Fernandes et al., 2007; Di Sotto et al., 2010; Klauke et al., 2014).

Fenilpropanóides, como o componente químico safrol, fontes de obtenção desse ativo a partir de espécies de *Piper* da Amazônia são muito promissoras (Bizzo et al., 2009) como um sintonia atraente para acessar diferentes classes químicas de compostos bioativos, como análogos de prostaglandinas, não esteróides agentes anti-inflamatórios e compostos

antitrombóticos (Barreiro e Fraga, 1999). Uma das substâncias muito importantes em *Piper* é o dilapiol, fenilpropanóide encontrado em grandes quantidades em *P. aduncum*, já testado com sucesso como fungicida (Silva et al., 2014), inseticida (Volpe et al., 2015), bactericida (Barbosa et al., 2012; Brazão et al., 2014), larvicida (Oliveira et al., 2013) e anti-inflamatório (Parise-Filho et al., 2011), tendo relevância para a produção de bioprodutos.

A aplicação de óleos essenciais cresceu significativamente, como alternativa e complemento de medicamentos no tratamento de doenças. As atividades biológicas dos óleos essenciais relacionados à sua composição química, submetidas a formulações farmacêuticas, têm sido alvo de potenciais inovações biotecnológicas (Raut e Karuppayil, 2014).

Os óleos essenciais possuem vários compostos bioativos, mas apresentam baixa solubilidade e biodisponibilidade devido às características apolares e lipofílicas, para reduzir isso, foram destacadas formulações com propriedades capazes de auxiliar e otimizar a farmacoterapia, por mencionar complexos de inclusão com ciclodextrinas, nanoformulações e microemulsões como fármaco sistemas portadores com grande potencial de aplicabilidade na área farmacêutica (Cheirsilp e Rakmai et al., 2017; Basak e Guha 2017).

Com tantas espécies produzindo óleos essenciais valiosos com uma rica composição fitoquímica, apresentando atividades biológicas e propriedades terapêuticas, o objetivo do estudo foi realizar uma revisão abrangente da literatura sobre os óleos essenciais de Piperaceae na região amazônica, com foco em seu potencial para elaboração de bioprodutos utilizando tecnologias farmacêuticas com nanotecnologia e ciclodextrinas.

3.1.2 Família Piperaceae

A família Piperaceae é uma das plantas tropicais mais antigas do mundo, juntamente com a família Chlorantaceae (Burger, 1971), considerada uma das angiospermas mais primitivas (Taylor e Hickey, 1992). Esta família pertence à ordem Piperales, com espécies distribuídas em todas as áreas tropicais, nos dois hemisférios, com maior concentração ocorrendo na América Latina e na Malásia (Figura 1) (Gogosz et al. 2012; Stevens 2012). Na América, dois gêneros principais têm a grande ocorrência: *Piper* e *Peperomia* (Cronquist, 1981). As espécies de Piperales têm uma apresentação diferente, sendo observadas como ervas, arbustos e arboretas, geralmente epífitas ou lianas (Guimarães e Valente, 2001), unissexuais ou bissexuais (Gartner, 1989). O caule costuma crescer simodialmente, apresentando folhas alternadas, simples, pecíolos e com ou sem estípulas (Souza e Lorenzi, 2005).

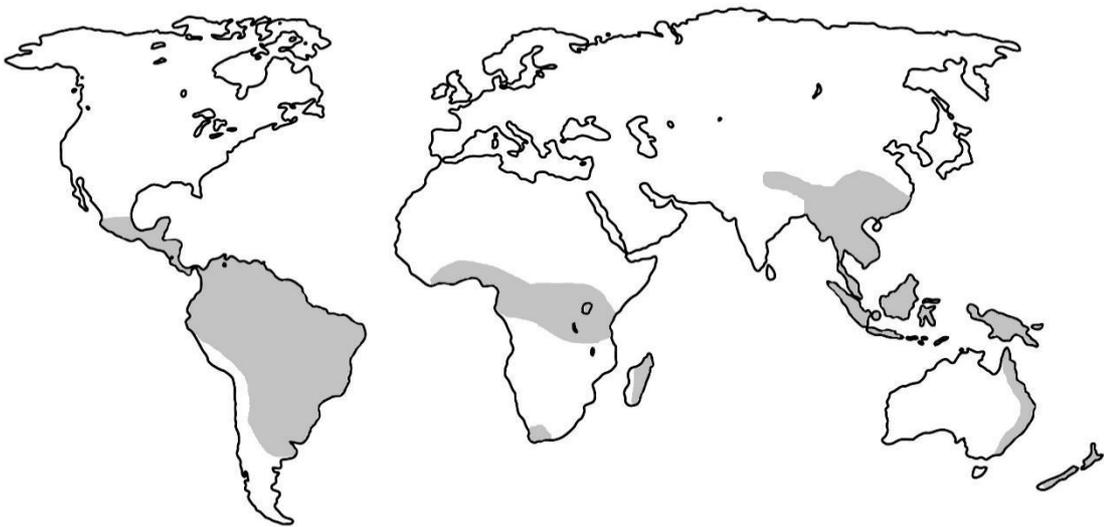


Figura 1. Distribuição geográfica da família Piperaceae. Adaptado de Stevens, 2012.

Muitas famílias botânicas têm uma distribuição global, no entanto, poucas delas têm uma rica história etnobotânica e etnofarmacêutica como a família Piperaceae. Ao longo dos

vários séculos em que essa família vem sendo estudada como medicamento popular e aditivo alimentar, seu risco para a saúde humana foi bem descrito como muito baixo, o que possibilita sua aplicação em vários produtos para uso humano (Tripathi et al. 1996; Parmar et al., 1997). O produto mais popular à base de Piperaceae é um pó de pimenta produzido com os frutos de *Piper nigrum* L. A pimenta preta foi comercializada como tempero no mundo, apresentando grande importância econômica em países tropicais, incluindo Índia, Indonésia, Vietnã, Malásia e Brasil (Simpson e Ogorzaly, 1995).

No Brasil, existem três gêneros reconhecidos: *Manekia* Trel., *Peperomia* Ruiz & Pav e *Piper* L., estes dois últimos foram classificados como os gêneros com maior número de espécies dentro da família (Frodin, 2004). Cerca de 500 espécies são encontradas no Brasil, ocorrendo principalmente na Mata Atlântica e na Amazônia (Souza e Lorenzi, 2005). O gênero *Piper* é considerado o gênero mais relevante de Piperaceae, abrangendo aproximadamente 700 espécies, divididas em ervas, arbustos e pequenos cipós, das quais 266 espécies são tipicamente brasileiras (Guimarães e Giordano, 2004). Muitas espécies de Piperaceae são usadas como especiarias e medicamentos em diferentes locais, incluindo Índia, Sudeste Asiático e África (Simpson e Ogorzaly, 1995). Pesquisadores focados na composição química do gênero *Piper* relataram a presença de muitos compostos bioativos (Bourbonnais-Spear et al., 2005). Essas substâncias estão presentes nas plantas como um importante mecanismo de defesa contra insetos, nematóides e fungos patogênicos (Evans et al., 1984; Parmar et al., 1997; Lee et al., 2001).

Na região amazônica, já foram relatadas 100 espécies de Piperaceae, com predominância do gênero *Piper* (Yuncker, 1972). Algumas dessas espécies foram descritas como fonte de óleos essenciais (Mesquita et al. 2005). Na Amazônia, o gênero *Piper* também possui uma grande importância econômica relacionada à composição química de seus óleos essenciais, que já são utilizados como matéria-prima em diferentes indústrias,

como farmacêutica, química e cosmética (Silva et al., 2014). O *Piper hispidinervum* C. DC., Conhecido como pimenta longa, foi identificado como fonte de um óleo essencial rico em safrol (Pimentel et al., 1998). Da mesma forma que a pimenta longa, *P. aduncum* L. (nome popular: pimenta de macaco) tem um óleo essencial de grande aplicação econômica, pois é rico em dilapiol (Parmar et al., 1997). Safrol e o dilapiol é conhecido por seu grande potencial biotecnológico, que atraiu a atenção de vários pesquisadores, como será discutido mais adiante.

As pesquisas com plantas aromáticas, principalmente as medicinais, têm considerado uma abordagem promissora na busca de novos compostos bioativos. Além disso, o conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais em países subdesenvolvidos, principalmente aqueles com florestas tropicais como a Amazônia, também pode servir como fator na busca de espécies bioativas (Elisabetsky, 1991).

3.1.3 Composição química de óleos essenciais de Piperaceae

Cerca de 30 artigos já haviam relatado a composição química de óleos essenciais extraídos de 20 espécies amazônicas dessa família. *P. hispidinervum*, *P. aduncum*, *P. auritum*, *P. arborium* e *P. hispidum* são as espécies mais estudadas da Amazônia, com destaque para a constituição volátil de seus óleos essenciais. Além desses, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies aromáticas amazônicas da família Piperaceae

Espécies	Substâncias majoritárias	Referências
<i>P. hispidinervum</i>	Safrol (folha)	Fazolin <i>et al.</i> 2007; Maia <i>et al.</i> 1987; Lima <i>et al.</i> 2009; Zacaroni <i>et al.</i> 2009; Sauter <i>et al.</i> 2012; Negreiros <i>et al.</i> 2015.

<i>P. auritum</i>	Safrol (folha)	Gupta <i>et al.</i> 1985; Monzote <i>et al.</i> 2010; Caballero-Gallardo <i>et al.</i> 2014
<i>P. divaricatum</i>	Safrol (folha e casca)	Barbosa <i>et al.</i> 2012
<i>P. aduncum</i>	Dilapiol (folha)	Fazolin <i>et al.</i> 2007; Almeida <i>et al.</i> 2009; Maia <i>et al.</i> 1998; Silva <i>et al.</i> 2009; Souto <i>et al.</i> 2012; Potzernheim <i>et al.</i> 2012; Volpe <i>et al.</i> 2015.
<i>P. hispidum</i>	Dilapiol (raiz)	Facundo <i>et al.</i> 2008
<i>P. permucronatum</i>	Dilapiol (folha)	
<i>P. gaudichaudianum</i>	Viridiflorol (folha)	Moraes <i>et al.</i> 2007
<i>P. humaitanum</i>	Óxido de cariofileno (folha)	
<i>P. hostmanianum</i>	Asaricina (folha)	
<i>P. tuberculatum</i>	β -cariofileno (folha e casca)	Navickiene <i>et al.</i> 2006; Facundo <i>et al.</i> 2008
<i>P. amapaense</i>	β -cariofileno (folha e casca)	
<i>P. duckei</i>	β -cariofileno (folha)	Santos <i>et al.</i> 1998
<i>P. bartlingianum</i>	α -cadinol (folha)	
<i>P. arboreum</i>	Biclogermacreno D (folha)	Mundina <i>et al.</i> 1998; Cysne <i>et al.</i> 2005; Navickiene <i>et al.</i> 2006; Nascimento <i>et al.</i> 2015
<i>P. nigrum</i>	Germacreno D	Jirovetz <i>et al.</i> 2002

<i>P. dilatatum</i>	Germacreno D	Andrade <i>et al.</i> 2011
<i>P. malacophyllum</i>	Cânfora	Santos <i>et al.</i> 2012
<i>P. marginatum</i>	Asarona	Autran <i>et al.</i> 2009

O registro mais antigo sobre a composição química dos óleos essenciais de Piperaceae foi publicado por (Alencar et al., 1971) com *P. hispidinervum*. Os óleos essenciais de Piperaceae são compostos principalmente por terpenos e fenilpropanóides (figura 2), onde o último é considerado uma classe grande, mas não muito diversificada, produzida por metabólitos especializados de plantas pela via do ácido chiquímico (Simões et al., 2007).

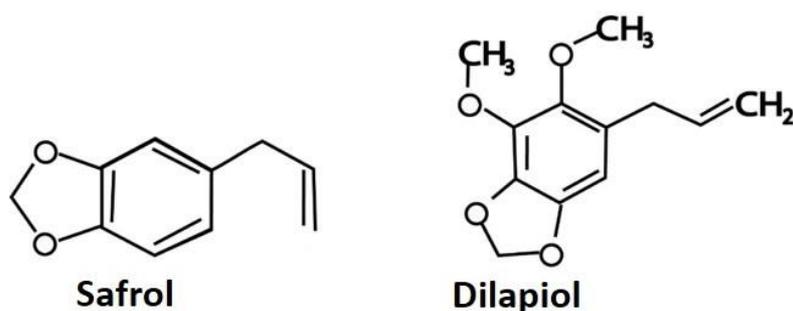


Figura 2. Principais fenilpropanóides do óleo essencial de Piperaceae

O safrol é um fenilpropanóide de grande importância econômica, pois é utilizado como matéria-prima em várias reações sintéticas. Sua principal relevância é atribuída à síntese de heliotropina (piperonal) (Grimshaw e Hua, 1994), um produto muito desejável pela indústria de perfumes como fixador de fragrâncias e na síntese de butóxido de piperonil (PBO), que é um pesticida sinérgico. A molécula de safrol é estruturalmente rica devido à capacidade de regioselectividade de funcionalizar todos os átomos de carbono presentes na estrutura. Essa possibilidade possibilita a conversão do safrol em outras estruturas moleculares, com possíveis atividades biológicas ou com maiores aplicações comerciais, como piperina e vanilina, que são utilizadas como antiinflamatórias e

antioxidantes, respectivamente (Barreiro e Fraga, 1999). As espécies da família Piperaceae tornaram-se fontes alternativas de safrol (Bizzo et al., 2009) e outros fenilpropanóides. O aprimoramento genético de *P. hispidinervum*, após sua propagação e adaptação vegetativa, tem se mostrado uma excelente alternativa aplicada às técnicas de cultivo que visam aumentar a produção de fenilpropanóide. Com esta técnica, o teor de safrol aumentou 10% do rendimento original, atingindo cerca de 98,0% de safrol (Maia et al., 1987; Bizzo et al., 2009). Cremasco e Braga (2010) propuseram a isomerização de safrol de *P. hispidinervum* em isosafrol no óleo essencial, visando a otimização e viabilização da síntese de heliotropina, sem a necessidade de isolamento de safrol.

As divergências e semelhanças entre as espécies são fantásticas *P. hispidinervum* e *P. auritum* são as espécies amazônicas que apresentam os mais altos níveis de safrol (85%) (Monzote et al., 2010); a maior parte da composição química de *P. aduncum* (64,4%) e *P. hispidum* (57,5%) é dilapiol, um fenilpropanóide relevante devido às suas excelentes atividades biológicas anti-inflamatórias e antibacterianas (Facundo et al., 2008; Parise-Filho et al., 2011; Brazão et al., 2014); em *P. marginatum*, aproximadamente 30% do óleo essencial é composto por isômeros de azarona (Autran et al., 2009). Além disso, tem sido relatado traços de eugenol em *P. auritum* e metileugenol em *P. hispidinervum* (Sauter et al., 2012).

Diante da riqueza bioativa de terpenos e fenilpropanóides, como as substâncias químicas safrol e dilapiol possuem características muito apolares e lipofílicas, que acarreta em problemas de solubilidade e dissolução, mesmo assim são indispensáveis para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos utilizando tecnologias como nanotecnologia e complexos de inclusão com ciclodextrinas para reduzir esses problemas (Pinheiro et al., 2017; Rakmai et al., 2017; Basak e Guha 2017).

Os principais terpenóides descritos para as espécies de Piperaceae da Amazônia pertencem às classes de monoterpênos e sesquiterpenos (Figura 3).

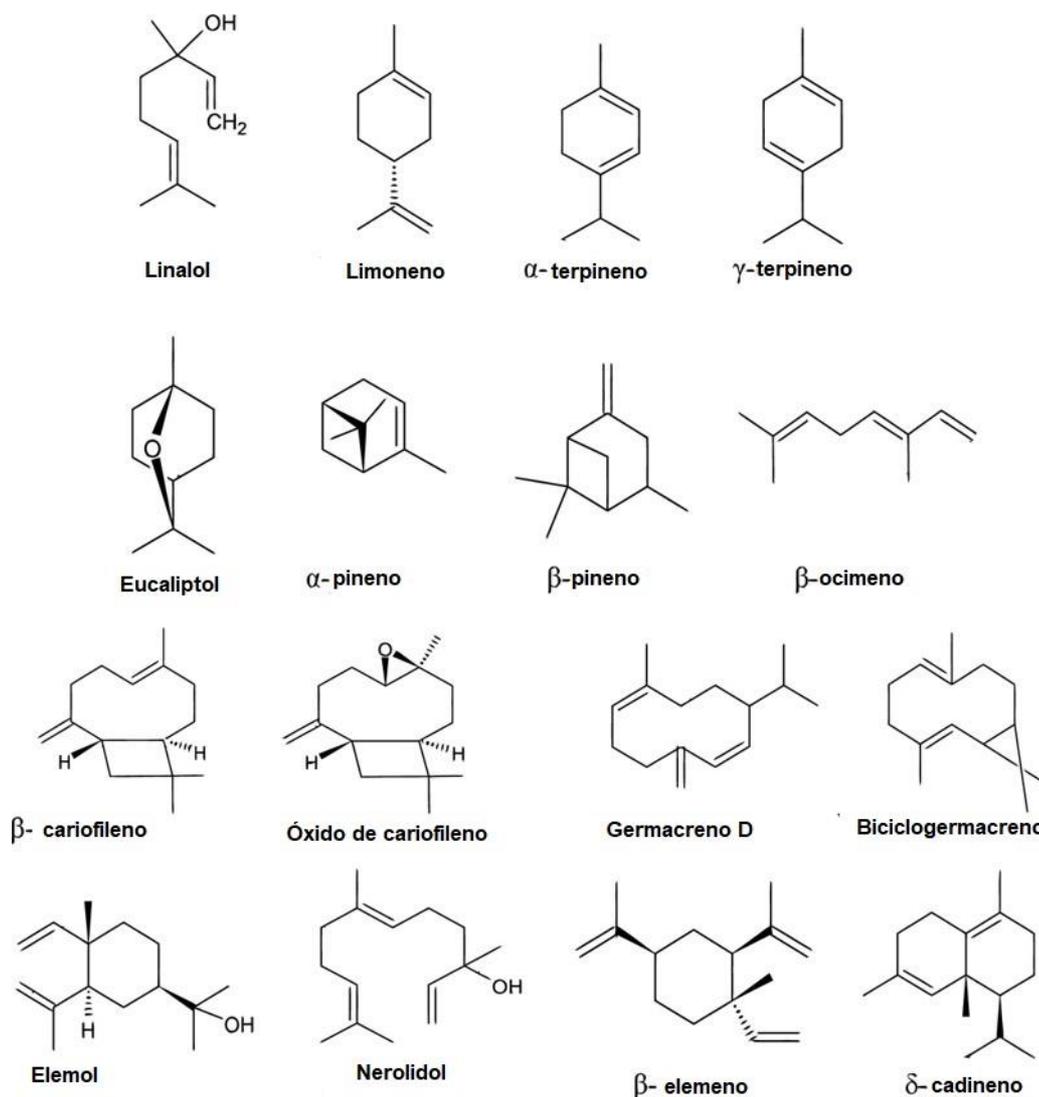


Figura 3. Principais terpenóides descritos nos óleos essenciais de espécies de Piperaceae da Amazônia.

O eucaliptol (1,8-cineol), monoterpêno oxigenado, participa da composição dos óleos essenciais das folhas de *P. aduncum*, correspondendo ao segundo constituinte principal (Oliveira et al., 2013). Linalol, também um monoterpêno oxigenado, também foi relatado na composição química dos óleos essenciais de *P. aduncum* como terceiro constituinte principal, representando 30% da composição dos óleos das folhas e 40% da composição dos óleos de frutas, aproximadamente (Navickiene et al., 2006).

Os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno, bem como o monoterpreno β -pineno, foram detectados com maior frequência em óleos essenciais de espécies de Piperaceae da Amazônia (Mesquita et al., 2005; Facundo et al., 2008; Autundo et al., 2009; Souto et al., 2012; Silva et al., 2014). O β -cariofileno é amplamente utilizado pelas indústrias química e farmacêutica devido às suas diversas atividades biológicas anti-inflamatórias (Pinheiro et al. 2017), anti-carcinogênico e analgésico (Fernandes et al., 2007; Di Sotto et al., 2010; Klauke et al., 2014).

Os principais terpenóides descritos nos óleos essenciais das espécies amazônicas de Piperaceae são mostrados na Figura 4.

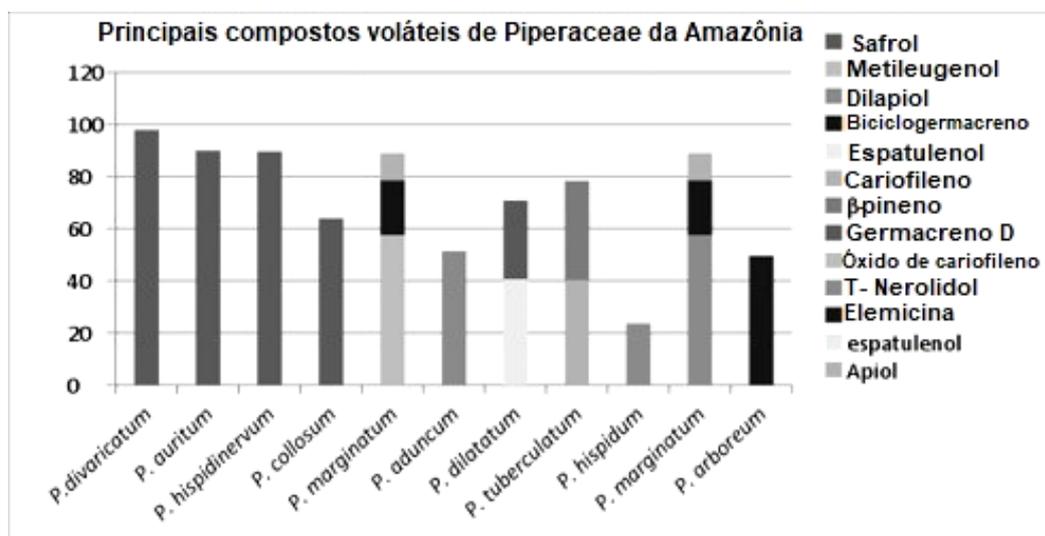


Figura 4. Terpenóides descritos nos óleos essenciais de espécies de Piperaceae da Amazônia.

3.1.4 Potencial bioativo de óleos essenciais da espécie amazônica Piperaceae

A quimiobiodiversidade de espécies da família Piperaceae fortalece seu potencial biofarmacológico, onde as espécies mais estudadas são as do gênero *Piper*, devido à sua etnobotânica e atividades biológicas valiosas (Parra et al., 2011).

Os estudos envolvendo espécies de *Piper* estão se intensificando, onde descrevemos as atividades biológicas na tabela 2 e identificamos que *P. aduncum* é a espécie mais estudada dessa família, uma vez que fortes atividades antifúngicas são atribuídas ao dilapiol, além de serem ativas também como bactericida e anti-inflamatório, essa riqueza de atividades biológicas é de grande valia para a intensificação de estudos sobre a inserção de dilapiol em formulações farmacêuticas para o uso desse ativo como bioprodutos eficazes para a indústria farmacêutica.

Tabela 2. Atividade biológica de espécies de Piperaceae na Amazônia

Espécie	Atividade biológica	Animal ou microorganismo	Dose, concentração ou CIM	Referências
<i>P. aleyreanum</i>	Antifúngico	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C. <i>sphaerospermum</i>	DL < 0.1 µg	Silva <i>et al.</i> 2014
	Antioxidante		DPPH 36.0 ± 0.9	Silva <i>et al.</i> 2014
	Anti-inflamatório	Ratos Swiss	ID ₅₀ 281,2 and 70,5 mg / kg	Lima <i>et al.</i> 2012
	Antinociceptivo	Ratos Swiss	ID ₅₀ 53,6 and 43,5 mg / kg	Lima <i>et al.</i> 2012
	Gastroprotetor	Ratos Swiss	ID ₅₀ 1,7 mg / kg	Lima <i>et al.</i> 2012

<i>P. aduncum</i>	Larvicida	<i>Aedes aegypti</i>	LD ₅₀ 0.009 mL	Oliveira <i>et al.</i> 2013
	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	CIM 250 and 500 µg/mL	Brazão <i>et al.</i> 2014
	Antifúngico	<i>Crinipellis perniciososa</i>	CIM 0.6 ppm	Almeida <i>et al.</i> 2009
	Biopesticida	<i>Solenopsis saevissima</i>	LC ₅₀ 58.4 mg/mL	Souto <i>et al.</i> 2012
	Anti-inflamatório	Ratos Wister	ID ₅₀ mg/kg	Parise-Filho <i>et al.</i> 2011
	Antifúngico	<i>Colletotrichum musae</i>	CIM 50 mg/ml	Bastos and Albuquerque, 2004
<i>P. anonifolium</i>	Antioxidante	-	DPPH 13.0 ± 2.3	Silva <i>et al.</i> 2014
	Antifúngico	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>C. sphareospermum</i>	DL ₅₀ 10.00 µg	Silva <i>et al.</i> 2014
<i>P. enckea</i>	Antifúngico	<i>Crinipellis perniciososa</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. Capsici</i>	CIM 1,0 µl/MI	Silva and Bastos, 2007

<i>P. marginatum</i>	Repelente	<i>Tribolium castaneum</i>	0,01 µg/mL	Jaramillo <i>et al.</i> 2015
	Inseticida	<i>Spodoptera littoralis</i>	167 mg/mL	Souto <i>et al.</i> 2012
	Antifúngico	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C. <i>sphareospermum</i>	CIM 1,0 µl/mL	Silva and Bastos, 2007
	Antifúngico	<i>Fusarium oxysporum</i>	CIM 10 µL	Santos <i>et al.</i> 2011
<i>P. hispidum</i>	Antioxidante		DPPH 26.4 ± 4.2	Silva <i>et al.</i> 2014
	Antifúngico	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C. <i>sphareospermum</i>	DL ₅₀ 100.00 µg	Silva <i>et al.</i> 2014

<i>P. hispidinervum</i>	Antifúngico	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CIM 100 µg/mL	Zacaroni <i>et al.</i> 2009
	Larvicida	<i>Tanaecium octurnum</i>	DL ₅₀ 0,000025 mL	Fazolin <i>et al.</i> 2007
	Inseticida	<i>Spodoptera frugiperda</i>	CL ₅₀ = 16,2 mg/mL	Lima <i>et al.</i> 2009
<i>P. divaricatum</i>	Antifúngico	<i>Fusarium solani</i>	CIM 0,75 mg/mL	Meireles, 2014
	Inseticida	-	LC ₅₀ 612.5 mg/mL	Souto <i>et al.</i> 2012
	Antifúngico	-	CIM 1,0 µl/MI	Silva <i>et al.</i> 2014
	Antioxidante	-	DPPH 34,69 ± 1,38	Oliveira <i>et al.</i> 2019
	Analgésico	<i>Colossoma macropomum</i>	40 µL.L ⁻¹	Vilhena <i>et al.</i> 2019
<i>P. dilatatum</i>	Antifúngico	<i>Crinipellis pernicioso</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	CIM 1,0 µl/mL	Silva and Bastos, 2007

<i>P. callosum</i>	Antifúngico	<i>Crinipellis pernicioso</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. capsici</i>	CIM 0,75 and 1,0 µl/mL	Silva and Bastos, 2007
	Inseticida	<i>Solenopsis saevissima</i>	LC ₅₀ 690 mg/mL	Souto <i>et al.</i> 2012
<i>Peperomia serpens</i>	Anti-inflamatório e antinociceptivo	Swiss mice	ED ₅₀ 188.8 mg/kg	Pinheiro <i>et al.</i> 2011

Outra espécie mais estudada no gênero é *P. hispidinervum*, com o safrol como substância principal, que também atua como fungicida, larvicida e inseticida. Em *P. aleyreanum*, o óleo essencial consiste principalmente de óxido de cariofileno com atividades antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora. Outro destaque é *P. marginatum*, que possui β-cariofileno em seus óleos como um de seus principais constituintes, com atividade repelente, inseticida e antifúngica (Tabela 2).

Em vista das importantes atividades biológicas que essas espécies de Piperaceae apresentam, é essencial inserir os ingredientes ativos em formulações farmacêuticas como nanoemulsões e ciclodextrinas, para proporcionar maior estabilidade e biodisponibilidade, agregando maior eficácia terapêutica desses bioprodutos.

3.1.5 Inclusão de óleos essenciais de Piperaceae em tecnologias farmacêuticas

As espécies de *Piper* apresentadas anteriormente têm grande importância farmacológica e sua inserção em tecnologias como ciclodextrinas e nanoformulações fortalece o uso desses produtos, pois protegem as substâncias bioativas naturais das condições de meio ambiente, melhora sua vida útil e biodisponibilidade, aumentando suas capacidades funcionais.

O estudo de Rakmai et al., (2017) mostra a potencialização da atividade do óleo essencial de pimenta preta (*P. nigrum*) que possui a principal substância β -cariofileno após inserção em complexos de inclusão com ciclodextrina HP- β CD. Com o óleo fora de um complexo de inclusão, a atividade antibacteriana apresentou concentração inibitória mínima (CIM) a $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* e para *Escherichia coli* apresentou CIM a $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com o óleo encapsulado em HP- β CD, a atividade antibacteriana da pimenta preta o óleo foi melhorado 4 vezes contra *S. aureus*, que apresentou CIM a $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *E. coli*, que teve CIM a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Santos et al., (2017) também testaram a complexação de β -cariofileno com M β -ciclodextrina, observando que esses complexos promoveram uma melhora significativa nas atividades anti-inflamatórias, de proteção gástrica e antioxidantes em relação ao β -cariofileno puro.

Nanoemulsões preparadas com o óleo essencial de pimenta preta (*P. nigrum*) usando ultrassom e homogeneização a alta pressão também foram testadas quanto às suas propriedades antimicrobianas contra as bactérias Gram (+) e Gram (-) (Jímenez et al., 2017). O óleo puro apresentou CIMs superiores a $500 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* e *E. coli*. As nanoemulsões apresentaram CIM a $150 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes*, *S. aures* (CIM $120 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e *S. enterica* (MIC $160 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Neste estudo, a atividade antimicrobiana dependia do tamanho das partículas. O óleo essencial de *P. nigrum* apresentou atividade antibacteriana potencializada quando inserido em nanoemulsões.

O mecanismo da atividade anti-inflamatória do óleo de *P. cubeba* puro e um sistema de liberação de nanoemulsão foi avaliado por Shakeel et al., (2015), o óleo essencial em nanoemulsões foram desenvolvidas por um método de titulação em fase aquosa. A dose pura de óleo essencial foi de 400mg.kg^{-1} de peso corporal, enquanto a nanoemulsão foi administrada em duas doses diferentes, 40mg.kg^{-1} e 80mg.kg^{-1} de peso corporal. Os

resultados da nanoemulsão foram superiores ao óleo puro, mesmo em doses significativamente mais baixas. Estes resultados indicam o potencial da nanoemulsão desenvolvida para melhorar a eficácia terapêutica do óleo essencial de *P. cubeba*.

Nos estudos de (Lucca et al., 2017), foram feitas nanoemulsões e espessamentos em hidrogéis com óleo de copaíba rico em β -cariofileno, que possui um potente anti-inflamatório e esta bioatividade reforça o uso dessa substância, que também está muito presente nas espécies de *Piper* da Amazônia. Os hidrogéis Carbopol® e hidroxietilcelulose apresentaram boa estabilidade, tamanho das gotículas e índice de polidispersividade. No teste de permeação cutânea, mostrou alta retenção na epiderme, seguida de menor retenção na derme. Além disso, o efeito anti-inflamatório foi observado com inibições de 69 e 67% no edema da orelha de camundongo e 32 e 72% no edema da pata de rato. Os cortes histológicos mostraram uma diminuição de fatores inflamatórios, como hiperplasia da derme e epiderme e infiltração de células inflamatórias. Outro trabalho de (Lucca et al., 2017) desenvolveu nanoemulsões de óleo de copaíba com carga positiva (PCN), com brometo de cetiltrimetilamônio e lilamina, em comparação com uma nanoemulsão com carga negativa (NCN) para estudos de permeação cutânea e antiedematogênica *in vivo*. Os resultados mostram que a permeação cutânea com PCN aumentou a retenção de cariofileno na epiderme três vezes. Os testes *in vivo* de edema de orelha de camundongo, NCN e PCN promoveram um edema de inibição (33%). No edema de pata de rato, ambas as nanoemulsões tiveram um efeito antiedematogênico (inibição de edema acima de 60%), o processo de nanoemulsificação levou a um efeito aumentado no óleo.

Uma das substâncias encontradas em espécies de *Piper* da Amazônia é o monoterpeno linalol. Sua inserção na tecnologia farmacêutica pode melhorar a baixa solubilidade aquosa, portanto, é necessária um veículo eficiente para melhorar sua administração e biodisponibilidade nos meios fisiológicos. Rodenak-Kladniew et al.,

(2017) estudou e encapsulou o linalol na tecnologia farmacêutica usando nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para testes *in vitro* em duas linhas celulares: hepatocarcinoma e adenocarcinoma do pulmão. Os NLS foram preparados com miristil miristato, ésteres cetílicos e cetil palmitados pelo método de sonicação com o Pluronic F68 como surfactante. O NLS apresentou uma forma esférica e diâmetros na faixa de 90-130 nm. Como porcentagens de encapsulamento do NLS foram superiores a 80% para todas as formulações e exibido registros de liberação controlados *in vitro* por menos de 72 h. Como formulações desenvolvidas, em particular o NLS com linalol e miristil miristato com uma concentração de 2,0 mM por 48 horas, realiza atividade anticâncer mais forte que o linalol livre, inibindo o crescimento celular em 76%. Uma microscopia de fluorescência mostrou um aumento na capacidade das nanopartículas de moléculas intracelularmente.

Para reduzir a volatilização e melhorar a biodisponibilidade do Linalol, transportadores lipídicos nanoestruturados carregados com linalol foram preparados nos estudos de (Shi et al., 2016). Eles foram preparados usando o método de homogeneização de alta pressão. Os ratos receberam $300 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ por sonda oral para estudos farmacocinéticos. A eficiência do encapsulamento foi de 79.56%. Todos os parâmetros farmacocinéticos e biodisponibilidade da aplicação farmacêutica foram os melhores que o linalol puro.

Nanoemulsões de linalol também foram estudadas quanto à atividade antibacteriana (Prakash et al., 2019) com uma intenção de uso em sistemas alimentares. Com uma adição de Tween 80 e água no ultrassom, foram instalados sistemas de emulsão para superar a baixa solubilidade em água do linalol, bem como sua alta volatilidade e baixa estabilidade. Como os nanoemulsões são estáveis com um diâmetro médio de $10,9 \pm 0,1 \text{ nm}$, a razão 1: 3 (v / v) de linalol e Tween 80. Observa-se um aumento da atividade

antibacteriana contra *Salmonella typhimurium*, atribuída a uma maior capacidade de permear uma membrana celular.

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do linalol para *S. typhimurium* foram 1,25 (v/v%), enquanto na nanoemulsão foram observadas CIM e CBM em concentrações mais baixas (0,625 v/v%). As nanoemulsões de Linalol também foram eficazes para reduzir os biofilmes de *S. typhimurium* na superfície do abacaxi cortado. Comparadas com o linalol puro, as nanoemulsões com o linalol apresentaram atividade antibiofilme 11,5% maior.

Os complexos de inclusão de ciclodextrina com linalol também foram estudados com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana (Aytac et al., 2017). O complexo apresentou características de dissolução rápida e a liberação de linalol a partir do complexo inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*). A atividade antibacteriana de HP β CD / linalol, M β CD / linalol e HP γ CD / linalol foi de $84 \pm 0,1\%$, $93 \pm 0,1\%$ e $95 \pm 0,2\%$ contra *E. coli* e $70 \pm 0,3\%$, $79 \pm 0,2\%$ e $88 \pm 0,5\%$ contra *S. aureus*, respectivamente. Em resumo, as características do linalol foram preservadas e proporcionam alta capacidade de carga, vida útil mais longa e atividade antibacteriana mais forte do que o linalol puro.

O linalol em tecnologia farmacêutica também foi estudado por Jabir et al. (2019). Inserido em nanopartículas de ouro conjugadas com um complexo com peptídeo CALNN, foi investigada sua citotoxicidade contra linhas celulares de câncer de mama. Houve baixa citotoxicidade na linha celular de câncer de mama após 48 horas de tratamento com linalol na concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. De fato, a formulação apresentou propriedades antiproliferativas e citotóxicas na concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, podendo matar mais de 70% das células. A propriedade apoptogênica da formulação também foi investigada. As alterações morfológicas da linha celular do câncer de mama, analisadas em microscópio de

contraste de fase invertida, mostraram características apoptóticas típicas, como perda de membrana.

Esses trabalhos mostram a importância de inserir os óleos essenciais de Piperaceae da Amazônia em tecnologias micro e nanotecnológicas, a fim de melhorar sua uso farmacológico. As atividades biológicas descritas para as espécies de Piper enfatizam a importância de mais estudos sobre a inserção desses bioprodutos em formulações farmacêuticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de tese foi estruturado por etapas conforme a figura 5 que mostra as etapas e os locais que foram desenvolvidos todos os estudos e experimentais.

<p>PARTE I – Análises químicas</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Extração de óleos essenciais; ➤ Perfil cromatográfico por CCD; ➤ Caracterização química dos óleos por CG-DIC e CG-EM; ➤ Fracionamento e isolamento; ➤ Análise das substâncias isoladas por CCDAE, CG-DIC, CG-EM. <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>	<p>PARTE II – Nanos</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Carreadores lipídicos nanoestruturados; ➤ Nanoemulsões; ➤ Hidrogéis com hidroxietilcelulose; ➤ Caracterização das formulações: tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia; ➤ Avaliações da liberação <i>in vitro</i>; ➤ Avaliações da permeação cutânea <i>ex vivo</i>. <div style="text-align: center;">  </div>
<p>PARTE III – Micros</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Complexo de inclusão do Dilapiol com ciclodextrina ➤ Caracterizações físico-químicas : FTIR, TG, DSC, DR-X, MEV. ➤ Microemulsões com Dilapiol; ➤ Diagrama de fases pseudoternário; ➤ Caracterização das microemulsões: tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade elétrica. <div style="text-align: center;">  </div>	<p>PARTE IV – Atividades biológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Toxicidade por HET-CAM; ➤ Antibacteriana e moduladora de antibióticos <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>

Figura 5. Etapas do projeto de doutorado

4.1 Coleta e identificação de material botânico

As folhas de *P. aduncum* L. foram coletadas na Universidade Federal do Amazonas, localizada em Manaus, Estado da Amazônia, Brasil (3°06'04.0"S 59°58'40.0"W), em uma tarde ensolarada em novembro - 2016. A amostra da espécie vegetal foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o número de identificação 205937.

4.1.2 Extração de óleo essencial

O óleo essencial de *P. aduncum* foi extraído na Universidade Federal do Amazonas no laboratório de pesquisa de produtos naturais, juntamente com o grupo Q-BiomA - Química de Biomoléculas da Amazônia. A extração foi realizada em extratores semi-industriais, utilizando 250 g de folhas secas, durante um período de duas horas. O óleo essencial foi coletado e seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄).

4.1.3 Cromatografia em camada delgada

O comportamento cromatográfico da amostra foi avaliado por Cromatografia em Camada Fina (CCD) usando placas cromatográficas normais de sílica gel (TLC Silica gel F254, Alugran, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm). As placas de sílica foram limpas com eluição em metanol e então ativadas em um forno a 100 °C por 1 h. Os eluentes foram preparados de acordo com a natureza da amostra, visando a melhor separação cromatográfica. Como revelador foi utilizado a luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vanilina sulfúrica.

4.1.4 Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC)

A identificação e caracterização das substâncias foram realizadas pelo CG-DIC. O equipamento utilizado foi o Trace 1310 (THERMO), amostra solubilizada na concentração de 5 mg / mL de hexano, com Split 1: 2 e vazão de 1,0 mL / minuto. Gás transportador: Helio, Coluna: VF-1ms (100% de dimetilpolisiloxano, 25 cm x 0,25 mm e 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 °C e 300 °C, respectivamente e o forno foi programado de 60 °C a 240 °C (2 °C / min), 240 °C a 290 °C (20 °C / min), isoterma em 300 °C por 5 min.

4.1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises das substâncias isoladas foram realizadas em cromatógrafo a gás com detecção espectrométrica de massa (CG-ME) (Modelo: QP2010MS, marca: Shimadzu). As amostras foram injetadas a uma concentração de 1 mg / mL usando hélio como gás transportador. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 ° C e 300 ° C, respectivamente e o forno foi programado de 60 ° C a 240 ° C (2 ° C / min), 240 ° C a 290 ° C (20 ° C / min), isoterma em 300 ° C por 5 min Os dados obtidos das injeções foram processados no programa Xcalibur 2.0.7. e comparado com dados da literatura especializada de (ADAMS, 2017).

4.2 Microemulsão com Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*

4.2.1 Microorganismos

Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* foram obtidas no laboratório de microbiologia e patologia da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cajazeiras - Paraíba, Brasil.

4.2.2 Drogas

Os fármacos utilizados nos testes foram ampicilina e vancomicina, na concentração inicial de 1024 mg mL⁻¹ dissolvida em água estéril.

4.2.3 Microemulsão com o diagrama de fases pseudoternário

Para identificar as regiões da microemulsão, o diagrama de fases pseudoternário foi obtido pelo método de titulação em fase aquosa à temperatura ambiente (25 °C), seguido de inspeção visual do resultado da mistura dos componentes. Dilapiol foi usado como uma fase oleosa, PEG-8 como um surfactante e água deionizada como uma fase aquosa.

O surfactante foi adicionado à fase oleosa em diferentes proporções. A fase aquosa foi titulada utilizando um pipetador em cada uma das proporções de fase oleosa e surfactante obtido. Após cada titulação, as misturas foram homogeneizadas por um disruptor ultrassônico de células por 1 minuto a 40% de amplitude, seguido por um banho ultrassônico de 1 minuto para remover possíveis bolhas e um período de descanso de 2 minutos para observar o aspecto final do sistema (Hu et al., 2011).

No final do período de descanso, as alterações na aparência visual das misturas foram analisadas contra um fundo escuro e classificadas de acordo com a aparência. Os resultados obtidos foram plotados em um triângulo equilátero com o auxílio do software Origin Pro® 8.0, no qual cada ponto de superfície corresponde à proporção definida dos componentes da mistura. A partir do diagrama obtido, uma proporção dos componentes na região de formação de sistemas transparentes foi selecionada.

4.2.4 Determinação de pH

O pH da formulação foi medido usando um medidor de pH digital (Modelo HI 221, Hanna instruments, Brasil), com eletrodo e sensor de temperatura previamente calibrado com o tampão 4.0 e 7.0 a $25 \pm 0,5$ °C.

4.2.5 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da formulação foi avaliada por um medidor de condutividade digital (Logen, Brasil), previamente calibrado com uma solução de calibração com condutância de $146,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. O eletrodo com um volume de 10 ml da formulação foram introduzidos diretamente. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.6 Tamanho da gota e potencial zeta

O diâmetro médio das gotículas, o índice de polidispersidade e o potencial Zeta foram obtidos por análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, França). As análises foram realizadas a uma temperatura constante de 25 °C, com um ângulo de incidência de 90 °C e um feixe de luz de 633nm. As amostras foram diluídas (1:200) antes da análise e cada medição foi feita em triplicata. O potencial zeta das microemulsões também foi medido em triplicata após diluição das amostras (1:100) em NaCl (1 mmol / L).

4.2.7 Concentração inibitória mínima e atividade moduladora

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada com 10% de BHI pelo método de microdiluição, utilizando uma suspensão de 105 UFC / mL, padronizada de acordo com NCCLS (2003). Utilizou-se um inóculo de 100 μL e uma quantidade de 100 μL da microemulsão, com concentrações variando de 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Javadpour et

al. 1996). A CIM é definida como a menor concentração na qual não foi observado crescimento microbiano. Para a avaliação da microemulsão como modificadores da resistência microbiana, a CIM foi determinada com drogas antibacterianas na presença e ausência de microemulsão, que estava em concentração sub-inibitória (MIC / 8). As concentrações adicionadas de drogas antimicrobianas usadas nesses ensaios variaram de 1024 µg / mL a 0,5 µg / mL para antibióticos e microemulsão. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

4.3 Complexos de Inclusão com ciclodextrinas

4.3.1 Complexos de inclusão

Os complexos de inclusão de DLP (Dilapiol) com β-CD (Beta ciclodextrina) e HP-β-CD (Hidroxipropil beta ciclodextrina) foram preparados por diferentes métodos: mistura física (PM), malaxagem (KND) e slurry (SL), seguindo a razão molar de 1: 1 (DLP: CD), considerando que o peso molecular ponderado de DLP (222,24 g.mol⁻¹) e o peso molecular de β-CD em 1134,98 g. mol⁻¹ e HP-β-CD a 1541,547 g / mol⁻¹.

4.3.2 Mistura Física (PM)

DLP-β-CD e DLP-HP-β-CD foram pesados separadamente, seguindo a razão molar de 1:1 e submetidos à homogeneização com pistilo. A amostra obtida foi armazenada em um dessecador até a análise.

4.3.3 Malaxagem (KND)

O método KND foi realizado de acordo com o procedimento descrito por (Pinheiro et al., 2017). Resumidamente, DLP-β-CD e DLP- HP-β-CD foram submetidos à homogeneização do pistilo, seguida pela adição de água purificada à formação de uma pasta (aproximadamente 10 mL de água para cada 1 g da mistura DLP / CD). A amostra obtida foi seca a 100 ° C até peso constante.

4.3.4 Slurry (SL)

O método SL foi realizado seguindo o procedimento descrito por (Pinheiro et al., 2017). Resumidamente, DLP- β -CD e DLP- HP- β -CD foram pesados e transferidos para um becker ao qual foi adicionada água purificada numa proporção de 3: 4 (v: w) para peso de DLP / CD, seguido de agitação durante 36 h à temperatura ambiente. A amostra obtida foi seca a 100 ° C até peso constante.

4.3.5 Caracterização Físico-Química

Para confirmar a formação dos complexos de inclusão, a caracterização físico-química foi realizada pelas análises de FTIR, SEM, DRX, TGA e DSC.

4.3.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica do FTIR foi realizada no instrumento IR Prestige-21, no qual as amostras foram colocadas diretamente no acessório ATR (Attenuated Total Reflectance). Os espectros de FTIR foram obtidos entre 4000 e 700 cm^{-1} usando 16 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As amostras foram montadas em stubs SEM com fita adesiva dupla e revestimento com ouro, onde as micrografias foram obtidas em um microscópio de mesa Hitachi TM-3000, operado com um potencial de aceleração de 15 kV, sob pressão reduzida com uma ampliação de 1000x.

4.3.8 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos usando um dispositivo Bruker D2 Phaser com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) e um filtro de Ni, gerado a 30 kV e 10 mA, com uma etapa de 0,02 ° usando um detector Lynxeye.

4.3.9 Análise termogravimétrica (TGA)

Os termogramas foram obtidos usando um termopar TGA-50 (Shimadzu®, Kyoto, Japão) na faixa de temperatura de 30-600 °C usando cadinhos de alumina com aproximadamente 2 mg de amostra sob uma atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL .min⁻¹). e taxa de aquecimento de 10 ° C.min⁻¹.

4.3.10 Concentração inibitória mínima e atividade moduladora

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada com 10% de BHI pelo método de microdiluição, utilizando uma suspensão de 105 UFC/mL, padronizada de acordo com NCCLS (2003). Utilizou-se um inóculo de 100 µL e uma quantidade de 100 µL da microemulsão, com concentrações variando de 1024 µg / mL a 16 µg / mL (Javadpour et al. 1996). A CIM é definida como a menor concentração na qual não foi observado crescimento microbiano. Para a avaliação dos complexos de inclusão como modificadores da resistência microbiana, a CIM foi determinada com drogas antibacterianas na presença e ausência de complexos de inclusão, que estava em concentração sub-inibitória (MIC/8). As concentrações adicionadas de drogas antimicrobianas usadas nesses ensaios variaram de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL para antibióticos e complexos de inclusão. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

4.4 Nanoformulações com Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*

4.4.1 Produtos químicos e reagentes

O Span 80®, o Tween 20® foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O Tween 80® foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil). Manteiga de cupuaçu, triglicerídeos de cadeia média (MCT) foram comprados da Mapric (São Paulo, Brasil). A hidroxietilcelulose foi adquirida da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida de um aparelho Milli-Q® (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). HCl, NaOH, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, lauril sulfato de sódio, hexano e metanol foram todos de qualidade analítica.

4.4.2 Condições cromatográficas

O conteúdo de dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* em diluições, formulações e matrizes biológicas foi determinado por um cromatógrafo a gás Shimadzu CG 2010

(Kyoto, Japão), com amostrador manual, equipado com um detector de ionização de chama (FID). A injeção foi feita no modo sem divisão. O sistema CG foi equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás portador era nitrogênio (1,0 mL / min) e a velocidade linear era de 32 cm / s. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 60 ° C por 1 min, de 60 ° C a 250 ° C a 50 ° C / min, de 250 ° C a 265 ° C a 5 ° C / min e de 265 ° C a 280 ° C a 50 ° C / min, permanecendo a 280 ° C por 2 min, finalizando a corrida cromatográfica a 10,10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 ° C e 300 ° C, respectivamente. O sinal foi gravado e processado com o software LabSolutions GC-Solution.

4.4.3 Procedimento de extração

A análise do dilapiol, principal composto de *P. aduncum*, foi determinada pelo procedimento de extração do espaço livre (SH), em condições otimizadas e com uma seringa de 1 mL. A extração foi realizada com frasco de 10 mL selado com septos e tampa de rosca, a 100 °C e agitação, durante 10 min, com adição de NaCl de 30% p / ve 100 µL da solução de referência ou amostra. Após a extração, 1 mL da amostra vaporizada dentro do frasco foi aspirada, inserida na porta de injeção do GC e analisada conforme descrito na Seção 2.3.

4.4.4 Método de validação

O método foi validado sob critérios analíticos e bioanalíticos para avaliar o conteúdo de dilapiol em soluções, formulações e amostras de pele [38–40]. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, recuperação e reporte. Para fins de validação bioanalítica, o fluido receptor, preparado conforme descrito na Seção 2.12.2, foi enriquecido com diferentes concentrações da solução de referência EOPA e analisado sob condições

otimizadas. Além disso, a pele da orelha de suíno, obtida conforme descrito na Seção 2.12.1, foi cortada em pequenos pedaços, colocados diretamente no frasco, enriquecidos com diferentes concentrações da solução de referência EOPA e analisados sob condições validadas.

4.4.5 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se o pico de retenção de dilapiol da solução de referência metanólica EOPA a 8,00 µg / mL com as interferências de matrizes em branco sem dilapiol de fitas usadas no método de remoção de fita para obter o estrato córneo, pele da orelha porcina (epiderme e derme) e o fluido receptor.

4.4.6 Linearidade e limites de detecção e quantificação

Experimentos de linearidade foram realizados com soluções de referência da EOPA preparadas em diferentes dias, considerando a presença ou ausência de matriz. As soluções de referência variaram entre 0,80 - 16,01 µg / mL, que não foram adicionadas com matriz complexa para fins analíticos ou com pele de orelha de porco (PES) ou fluido receptor (RF) para fins bioanalíticos. A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi aplicada aos resultados. Com base no desvio padrão da resposta e na inclinação dos dados de calibração, foram determinados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Todas as amostras foram analisadas nas condições otimizadas, conforme relatado anteriormente (Seções 2.3 e 2.4).

4.4.7 Precisão e exatidão

A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada através da investigação de amostras em três concentrações diferentes (0,80, 8,00 e 16,01 µg / mL para RF e 2,00, 8,00 e 16,01 µg / mL para PES) com cinco determinações para cada concentração. Para fins analíticos, a

precisão intra-dia foi realizada em três concentrações diferentes (0,80, 8,00 e 16,01 µg / mL para Referência), com três determinações cada. A precisão inter-dias (precisão intermediária) foi avaliada em três dias diferentes pelos mesmos níveis de concentração. A precisão é apresentada como porcentagem relativa de desvio padrão (% RSD) para cada concentração. A avaliação da precisão realizada após a adição de quantidades conhecidas de solução de referência de EOPA em três concentrações diferentes (0,80, 8,00 e 16,01 µg / mL para Referência, 0,80, 8,00 e 16,01 µg / mL para RF e 2,00, 8,00 e 16,01 µg / mL para PES). As amostras foram avaliadas em cinco repetições para fins bioanalíticos e em três repetições para fins analíticos, em três dias diferentes. Os resultados são mostrados como porcentagem relativa do desvio padrão da diferença entre o valor medido e o valor teórico.

4.4.8 Recuperação

Para determinar os parâmetros de recuperação, quantidades conhecidas de solução de referência EOPA em três concentrações diferentes foram aumentadas em RF e PES (0,80, 8,00 e 16,01 µg / mL para RF e 2,00, 8,00 e 16,01 µg / mL para PES). Em seguida, as amostras foram extraídas e analisadas por HS-GC-FID, conforme descrito nas Seções 2.3 e 2.4, e a recuperação do dilapiol foi obtida da seguinte forma: $RE\% = (BM / AM) * 100$, onde: RE% é o valor recuperado após a extração, BM é a concentração obtida da matriz biológica enriquecida com solução de referência e AM é a concentração obtida na ausência da matriz. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são expressos em recuperação por extração (% RE) e desvio padrão relativo (% RSD).

4.4.9 Carry over

A transferência foi investigada juntamente com a precisão entre os dias. Nesse sentido, logo após a injeção da maior concentração da curva de calibração, duas amostras

em branco foram injetadas. O efeito de transição nas amostras em branco não deve ser superior a 20% do limite de quantificação (LOQ) [38,40,41].

4.4.10 Preparação de nanoemulsão e carreador lipídico nanoestruturado

Para avaliar o impacto na estabilidade e aplicação *in vitro* de diferentes nanossistemas lipídicos contendo EOPA, uma nanoemulsão e um transportador lipídico nanoestruturado foram desenvolvidos. Os componentes de ambos os nanossistemas lipídicos estão destacados na Tabela 1.

Para preparar a nanoemulsão (NE), a fase aquosa contendo Tween 20® e a água ultrapura e a fase oleosa contendo o óleo essencial de *Piper aduncum*, MCT e Span 80® foram pesadas e misturadas separadamente por 5 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa, sob agitação magnética à temperatura ambiente, para formar uma emulsão grossa. Portanto, essa emulsão grossa foi submetida ao Ultra-Turrax (Ultra-Turrax® T8, IKA, Alemanha) por 1 min a 13500 rpm e ainda à homogeneização a alta pressão (Emulsiflex-C®, Avestin, Canadá) por 6 ciclos a 750 barras para reduzir o tamanho das gotículas. Uma nanoemulsão em branco (B-NE) também foi preparada nas mesmas condições, exceto que não continha óleo essencial de *P. aduncum*.

O transportador lipídico nanoestruturado (NLC) foi preparado da mesma maneira, substituindo parte do MCT por um lipídio sólido (manteiga de Cupuaçu), que requereu aquecimento durante a preparação ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Além disso, também foi preparado um lipídeo transportador nanoestruturado em branco (B-NLC), substituindo o óleo essencial de *P. aduncum* por MCT, mantendo o núcleo oleoso na mesma proporção.

Todas as formulações foram preparadas em triplicado, armazenadas sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e protegidas da luz.

Tabela 3. Composição das formulações que contêm ou não o óleo essencial de *Piper aduncum* (% , p / p).

Constituents	B-NE	B-NLC	NE	NLC	HB	HB-NE	HB-NLC	HNE	HNLC
OEPA	-	-	5	5	-	-	-	5	5
MCT	10	5	5	-	-	10	5	5	-
Span 80 [®]	2.5	2.5	2.5	2.5	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Tween 20 [®]	2.5	2.5	2.5	2.5	-	2.5	2.5	2.5	2.5
Cupuaçu butter	-	5	-	5	-	-	5	-	5
Hydroxyethylcellulose	-	-	-	-	1	1	1	1	1
Water q.s.	100	100	100	100	100	100	100	100	100

EOPA: óleo essencial de Piper aduncum; MCT: triglicerídeo de cadeia média; q.s. : quantum satis; B-NE: nanoemulsão em branco; B-NLC: transportador lipídico nanoestruturado em branco; NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de Piper aduncum; NLC: transportador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de Piper aduncum; HB: hidrogel de hidroxietilcelulose em branco; HB-NE: nanoemulsão em branco espessada em hidrogel; HB-NLC: transportador lipídico nanoestruturado espessado em hidrogel; HNE: nanoemulsão espessada em hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HNLC: transportador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel contendo *P. aduncum*.

4.4.11 Preparação de hidrogéis de hidroxietilcelulose contendo nanossistemas lipídicos

Os hidrogéis de hidroxietilcelulose foram preparados adicionando 1% p / p do polímero diretamente à formulação (NE, NLC, B-NE, B-NLC) e sob agitação magnética por 1 hora. O hidrogel formado foi deixado a inchar durante a noite a 4 ± 2 ° C. Além disso, o pH foi ajustado próximo ao pH da pele (cerca de 5) com ácido clorídrico 1 M ou NaOH 0,1 M.

Todos os hidrogéis foram preparados em triplicado, armazenados sob refrigeração (4 ° C \pm 2 ° C) e protegidos da luz. A composição das formulações espessadas é apresentada na Tabela 1.

4.4.12 Caracterização de nanossistemas lipídicos e hidrogéis derivados

Após a preparação, os nanossistemas lipídicos e os hidrogéis derivados foram caracterizados por aspectos organolépticos, como cor, odor e aparência, conteúdo de dilapiol (%), tamanho das gotículas, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta e morfologia. Além disso, a estabilidade físico-química das formulações foi avaliada durante 30 dias a temperatura de armazenamento de 4 ± 2 ° C, considerando aspectos organolépticos, conteúdo de dilapiol (%), tamanho de gotícula, índice de polidispersividade e potencial zeta.

4.4.13 Avaliação do conteúdo de dilapiol em nanossistemas lipídicos e hidrogéis derivados

A quantificação do marcador principal do óleo essencial de *P. aduncum*, dilapiol, foi determinada por HS-GC-FID. Resumidamente, 1 g do nanossistema lipídico ou hidrogel derivado foi pesado em um balão volumétrico calibrado de 5 mL e cheio com metanol para obter uma solução estoque com uma concentração teórica de 10000 µg / mL do óleo essencial. Além disso, uma diluição em água foi realizada em um balão calibrado de 10 mL, obtendo uma concentração de dilapiol de 80,07 µg / mL. Em seguida, 100 µL desta solução de referência foram adicionados a um frasco de 10 mL e o conteúdo de dilapiol foi determinado de acordo com a metodologia validada descrita nas Seções 2.3 e 2.4. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (DP) do conteúdo percentual (%).

4.4.14 Tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das gotículas e o índice de polidispersidade foram medidos em triplicado por espalhamento dinâmico de luz (DLS) após diluição de 10 µL da nanoemulsão ou transportador lipídico nanoestruturado em 10 mL de água purificada filtrada com fluoreto de polivinilideno (PVDF) filtro de membrana de 0,45 µm-poros (1: 1000) (Zetasizer Nanoseries ZN90, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). O potencial zeta foi medido em triplicado no mesmo equipamento por espalhamento eletroforético de luz após diluição de 10 µL da nanoemulsão ou transportador lipídico nanoestruturado em 10 mL de

NaCl (1 mM) filtrado com filtro de membrana de poros PVDF de 0,45 μm (1: 1000) . As medidas são mostradas como média \pm DP.

4.4.15 Morfologia das formulações

O tamanho e a morfologia da nanoemulsão, do transportador lipídico nanoestruturado e dos hidrogéis contendo óleo essencial de *P. aduncum* foram examinados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um microscópio JEM-1200 EXII (Jeol, Tóquio, Japão), operando a uma tensão acelerada de 80 kV . Para as análises, as amostras foram diluídas com água ultrapura (1:25, v / v), distribuídas em grelhas de cobre revestidas com formvar (malha 400) e coradas com solução aquosa de acetato de uranila (2%).

4.4.16 Comportamento reológico dos hidrogéis

O perfil reológico dos hidrogéis (HB, HB-NE, HB-NLC, HNE e HNLC) foi determinado a $25 \pm 0,5$ ° C por um viscosímetro rotacional Brookfield DV-II + (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, EUA), utilizando o fuso SC- 18 O comportamento reológico foi realizado com 10 g de amostras, em triplicado, com velocidades de rotação aumentando progressivamente de 6 para 50 rpm e diminuindo gradualmente para 6 rpm, respeitando os limites dos valores de torque (acima de 10% e abaixo de 100%). Os reogramas são apresentados como tensão de cisalhamento (D / cm^2) vs taxa de cisalhamento ($1 / \text{s}$) e viscosidade (centipoise, cP) vs taxa de cisalhamento ($1 / \text{s}$), e os resultados são expressos como média \pm DP. Além disso, o comportamento do fluxo reológico foi determinado após o ajuste dos resultados em diferentes modelos matemáticos de fluxo (Bingham, Ostwald, Casson e Herschel-Bulkley).

4.4.17 Medições de bioadesão

As propriedades bioadesivas das formulações (NE, NLC, HNE e HNLC) foram avaliadas por um testador de tensão de tração (TA.XTplus Texture Analyzer, Stable Microsystem, Godalming, Reino Unido). O experimento foi realizado com a pele do ouvido

de suíno obtida como descrito na Seção 2.12.1 e deixada hidratada durante 30 min em tampão fosfato 7.4 antes do experimento. A pele suína foi fixada em uma sonda (P / 10) com o auxílio de uma fita adesiva (fita 3M) e aquecida até 32 ± 2 ° C antes da montagem do equipamento. No suporte de Teflon imerso em banho-maria a 32 ± 2 ° C, posicionado abaixo da sonda, foram adicionados 400 µL da formulação (NE, NLC, HNE ou HNLC). A sonda foi abaixada a uma velocidade constante de 1 mm / s até atingir a pele suína. Uma força de contato de 9,8 mN foi aplicada contra a pele por 1 min. Além disso, a sonda foi levantada com uma força de disparo de 1 mN e uma velocidade constante de 0,5 mm / s até a separação completa da formulação e da pele suína. O trabalho de adesão (nM.mm), uma medida direta de bioadesão [42] e a força máxima de descolamento (mN) foram determinados e aplicados para comparar as propriedades bioadesivas das formulações. Os resultados são expressos como média \pm DP (n = 6). A análise estatística foi obtida por ANOVA, seguida do teste post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4.18 Estudos de liberação

Um estudo de liberação de dilapiol de EOPA, NE, NLC, HNE e HNLC foi realizado através de membrana de éster de celulose sintética (diâmetro de poro de 50 nm, Millipore®, EUA) em um sistema manual de célula de difusão do tipo Franz com área de difusão de 1,77 cm² (VhTex®, Brasil). Antes, as membranas sintéticas foram hidratadas por 30 min com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. O compartimento do receptor consistia em 12 mL de fluido receptor (uma mistura de PBS pH 7,4 e 0,3% v / v de Tween 80®) e foi mantido sob agitação (500 RPM) e temperatura controlada ($32 \pm 1,0$ ° C). No compartimento doador, foram colocados 15 µL de EOPA (correspondendo a 5% de EOPA no núcleo oleoso das formulações) ou 300 µL de NE, NLC, HNE e HNLC. O experimento, que teve como objetivo estimar o conteúdo de dilapiol liberado do EOPA e das formulações, durou 12 horas e, de tempos em tempos, 0,5 mL do fluido receptor foi retirado para análise e o mesmo volume de fluido fresco foi substituído para manter a pia.

doença. No final do experimento, alíquotas do meio receptor foram analisadas por HS-GC-FID, conforme descrito nas seções 2.3 e 2.4. Os resultados são expressos como porcentagem de liberação de dilapiol (média \pm DP, n = 3).

4.4. 19 Estudo de permeação / retenção de pele de orelha suína in vitro

Pele da orelha suína

As orelhas de suínos foram obtidas em Ouro do Sul (Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior Ltda, Harmonia, Brasil). A pele foi retirada da parte externa da orelha com o auxílio de um bisturi. A pele da orelha de porco foi cortada em fatias circulares com uma espessura entre 0,9 - 1,1 mm (No. 7301, Mitutoyo Corporation, Japão). A pele foi limpa com água e a camada de hipoderme e os pêlos superficiais foram removidos com tesoura e bisturi. Para manter a integridade, as amostras de pele foram embrulhadas em papel alumínio e armazenadas em freezer ($-20 \pm 2,0$ ° C) até serem utilizadas em estudos de permeação / retenção por até 30 dias.

Fluido receptor

O fluido receptor para as experiências de permeação / retenção consistiu em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 contendo 0,3% v / v de Tween 80®.

Estudos de retenção / permeação

O estudo de permeação / retenção de pele foi realizado com pele de orelha de porco (n = 5) em um dispositivo de difusão vertical do tipo Franz (VhTex®, Brasil). EOPA ou formulações foram adicionadas diretamente à pele no compartimento doador (15 ou 300 μ L, respectivamente). Após 8 h, a pele foi removida do aparelho e o excesso de óleo essencial ou formulação foi lavado de sua superfície usando água purificada. O excesso de pele foi cortado com auxílio de tesoura, mantendo a porção em contato com a formulação. Além disso, a técnica de decapagem com fita foi empregada na pele viável para separar o estrato córneo das outras camadas (fita Scotch 3 M nº 750). Epiderme e derme foram

separadas após raspagem com bisturi. Fitas (contendo estrato córneo), epiderme, derme e alíquotas de líquidos foram congeladas (-20 °C) para posterior análise por HS-GC-FID. Todas as amostras foram colocadas diretamente nos frascos sem adição de solventes, mantendo o conteúdo aquoso de 100 µL, e a determinação do dilapiol foi realizada e os resultados são expressos em µg / cm² (média ± DP).

4.4.20 Teste de toxicidade HET-CAM

O teste da membrana corioalantóica do ovo da galinha (HET-CAM) foi realizado para identificar o potencial irritante das formulações desenvolvidas [44,45]. Os ovos de galinha fertilizados foram doados a Mercoaves (Bom Princípio, Brasil) e incubados a 37 ± 1 ° C e umidade de 60 a 70% durante 10 dias em uma incubadora automática (Chocar Chocadeiras, Conceição do Coité, Brasil). No 10º dia, para garantir a fertilidade, os ovos foram acondicionados antes do experimento. Além disso, os ovos tiveram a casca removida na célula aérea e a membrana interna removida, expondo a membrana corioalantóica (CAM). Em seguida, 300 µL da substância ou formulação de teste foram colocados na CAM e as reações vasculares foram observadas durante 300 segundos (n = 5). Como controle negativo, foi aplicada a solução de NaCl a 0,9% p / v, enquanto lauril sulfato de sódio a 1% p / v e NaOH 0,1 M foram utilizados como controle positivo. O azeite de oliva foi empregado como diluente não irritante para a EOPA e também foi adotado como controle negativo [46]. Devido à opacidade de B-NE, B-NLC, NE, NLC, HB-NE, HB-NLC, HNE e HNLC, as formulações foram enxaguadas após 20 segundos após a aplicação com solução de NaCl 0,9 p / v e também foram avaliadas alterações vasculares. Os desfechos de hemorragia, vasoconstrição e coagulação de cada grupo foram monitorados para calcular o escore de irritação (IS), da seguinte forma (Equação 1):

$$IS = [5 \times (301 - \text{tempo de hemorragia}) / 300] + [7 \times (301 - \text{tempo de vasoconstrição}) / 300] + [9 \times (301 - \text{tempo de coagulação}) / 300] \text{ (Eq. 1)}$$

Os resultados foram expressos como média do SI e desvio padrão relativo em porcentagem (RSD%) e foram classificados pela média como não irritante [0,0 - 0,9], levemente irritante [1,0 - 4,9], moderadamente irritante [5,0 - 8,9] e extremamente irritante [9,0 - 21,0].

4.4.21 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism® Software v.06 (GraphPad Software, EUA) por Análise de Variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey (nível de significância $p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Extrações de óleo essencial de *P. aduncum*

As folhas de *P. aduncum* L. foram coletadas na Universidade Federal do Amazonas, localizada em Manaus, Estado da Amazônia, Brasil (3°06'04.0"S 59°58'40.0"W), em uma tarde ensolarada em novembro - 2016. A amostra da espécie vegetal foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o número de identificação 205937. A extração foi realizada por arraste a vapor no extrator elétrico, onde as extrações foram realizadas em triplicatas, obtendo os valores mostrados na tabela 4:

Tabela 4. Dados de extração do óleo essencial das folhas de *P. aduncum* por arraste a vapor no extrator elétrico

<i>P. aduncum</i>	Massa da amostra	Massa do óleo	Rendimento	Rendimento médio	Desvio padrão
Folhas					
1ª extração	250 g	5,1192 g	2,02%	2,08%	

2ª extração	250 g	5,4751 g	2,16%	0,05779
3ª extração	250 g	5,2924 g	2,08%	

A quantidade de cada extração de óleo das folhas resultou em um alto rendimento, e pode ser considerado adequado para um processo extrativo. Os rendimentos obtidos nas extrações foram considerados próximos quando comparados ao trabalho de CORRAL (2014), que obteve rendimento de 3,12%, mas utilizou grande quantidade de material, 8 kg de folhas.

5.2 Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama e espectrometria de massa

A análise química do óleo essencial de *P. aduncum* foi realizada por GC-MS, revelando a presença de 4 compostos, sendo o mais abundante o dilapiol (80,05%), seguido pelo β -cariofileno (10,65%). A composição química do óleo e seu cromatograma de espectrometria de massa são mostrados na Tabela 5 e na Fig. 6.

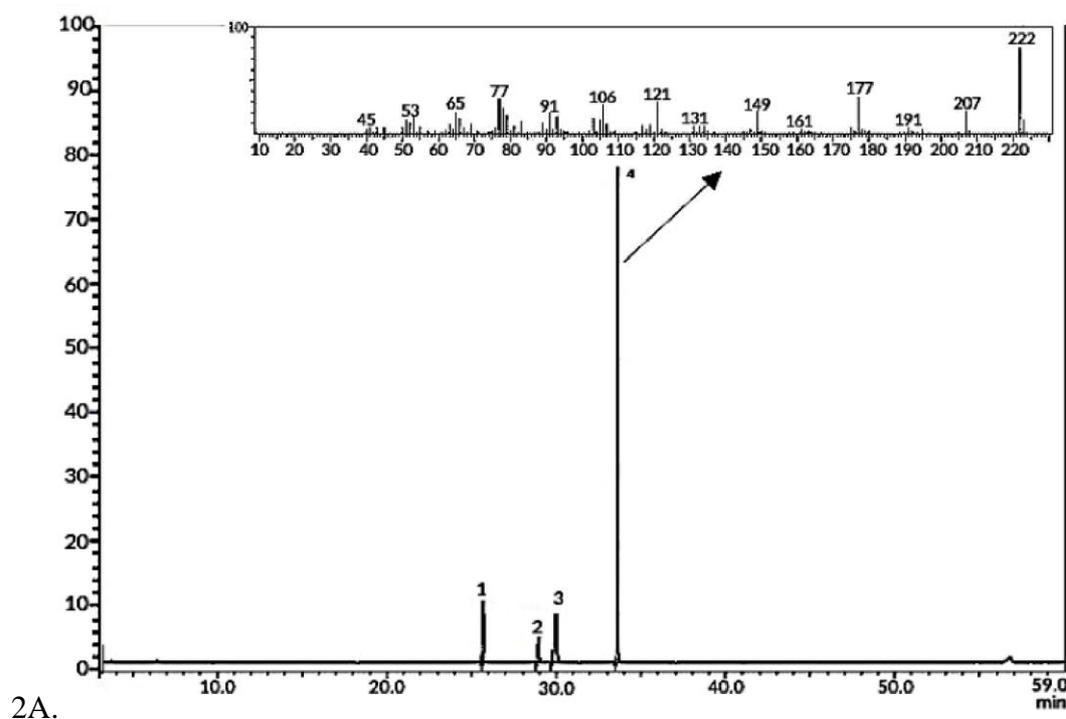


Figura 6. Cromatograma de cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa do óleo essencial de *P. aduncum* e espectro de massa de dilapiol (Fig. 2A). Os compostos

no cromatograma de espectrometria de massa são β -cariofileno (1), biciclogermacreno (2), n-pentadecano (3) e dilapiol (4).

Table 5. Composição química do óleo essencial das folhas de *Piper aduncum*

Picos	Substâncias	TR (min)	RI calc.	RI lit.	KI calc.	KI lit.	Area (%)*
1	β -cariofileno	25357	1425	1419	1417	1419	10.65%
2	Biciclogermacreno	28833	1503	1500	1507	1500	2.18%
3	n-pentadecano	28944	1506	1500	1517	1500	7.12%
4	Dilapiol	33668	1624	1620	1620	1620	80.05%
Total de substâncias							100%

RT: Tempo de retenção; RI calc.: Índice de retenção calculado; RI lit.: Índice de retenção da literatura; KI calc.: Índice de Kovats calculado; KI lit.: Índice de Kovats da literature (Adams, 2017).

A fragmentação em massa de dilapiol (figura 6) indicou picos habituais m/z 222, m/z 207 e m/z 177, confirmando sua identidade (Adams, 2017) e presença como o principal composto do óleo essencial de *P. aduncum*. Na literatura, o dilapiol já foi relatado em altas concentrações em *P. aduncum*. Maia e co-autores mostraram que o dilapiol representa entre 31,5% e 97,30% do óleo essencial de *P. aduncum* (Maia et al., 1998). Maia e Andrade identificaram o dilapiol como a principal substância na nesta espécie, compreendendo 88,4% do conteúdo (Maia e Andrade, 2009). Finalmente, o dilapiol também foi relatado no óleo essencial de *P. aduncum* em concentrações variando de 52% a 73% (Andrade e Faria, 2010). Nesse sentido, o dilapiol encontrado na óleo essencial desta espécie neste estudo esta de acordo com os relatos da literatura.

5.3 Microemulsão com Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*

5.3.1 Diagrama de fases pseudoternário (DFPT)

A obtenção do DFPT é uma ferramenta essencial para determinar em que proporções dos componentes existem áreas da microemulsão e mostrar a região mais adequada para a escolha da formulação na qual a substância de interesse será incorporada (Formariz et al., 2005). Os elementos selecionados para obter o diagrama como surfactante,

fase aquosa e fase oleosa foram PEG-8 (glicerídeo capríco / caprílico), água e dilapiol, respectivamente. A seleção de emulsificantes adequados, capazes de formar monocamada ou multicamada em torno de gotículas de óleo, a fim de reduzir a tensão interfacial e / ou aumentar a repulsão entre as gotículas, é um dos principais fatores relacionados à estabilidade do sistema microemulsificado (Bruxel et al., 2012). O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) é importante ao selecionar surfactantes adequados para microemulsões. Assim, para os métodos deste trabalho, os surfactantes EHL foram utilizados na faixa de 8 a 18 para obter microemulsões água / óleo (Singh et al, 2013).

O PEG-8 (glicerídeo capríco / caprílico) é um surfactante não iônico que tem sido amplamente utilizado para solubilizar substâncias hidrofóbicas. O PEG-8 é uma mistura de mono, di e triglicerídeos e mono e diésteres dos ácidos graxos do PEG 400. Possui EHL entre 12 e 14, sendo ideal para a obtenção de microemulsão O / A e tem baixa toxicidade (Strickley, 2004; Ujhelyi et al., 2012).

A Figura 7 representa o DFPT obtido neste estudo, que caracteriza o comportamento das misturas das fases surfactante, óleo e água. Observou-se uma diversidade de estados, destacando a presença de áreas de formação de microemulsão, destacadas nos pontos da figura, que são regiões onde a energia utilizada e as proporções dos componentes foram adequadas para reduzir a tensão interfacial até a formação de um sistema homogêneo, clara e transparente (Silva et al., 2009)

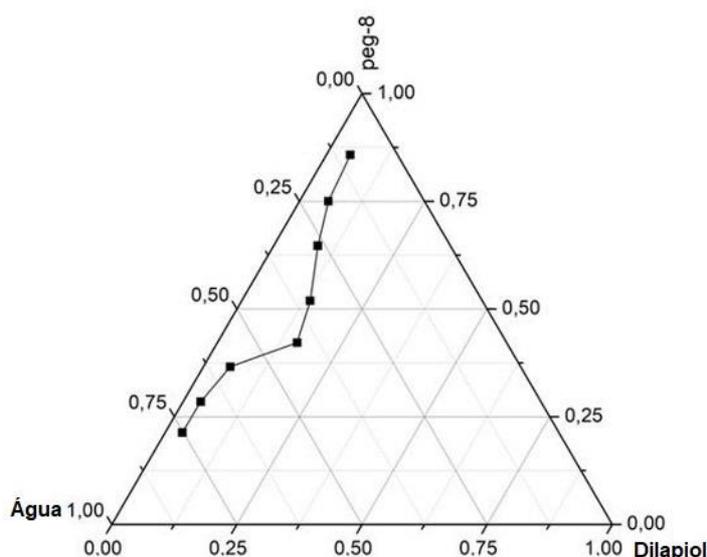


Figura 7 - Diagrama de fases pseudoternário para o sistema PEG-8, dilapiol do óleo *de P. aduncum* e água.

A partir do DFPT obtido, foram selecionadas formulações para incorporar dilapiol. Os itens listados abaixo mostram as proporções dos componentes da formulação. O ponto do diagrama que representava um tipo de óleo em água (O / A) foi escolhido, esse ponto é destacado na Figura 7.

A composição percentual (p / p) das formulações selecionadas foram:

1. A formulação com surfactante PEG-8 a 50%, fase oleosa com dilapiol a 5% e fase aquosa com 45% de água.
2. A segunda formulação foi com surfactante PEG-8 a 50%, fase oleosa com dilapiol a 10% e fase aquosa com 40% de água.
3. E a terceira formulação com surfactante PEG-8 a 50%, fase oleosa com dilapiol a 15% e fase aquosa com 35% de água

Damasceno et al. (2011) afirmam que o encapsulamento máximo de uma substância pode ser alcançado através de sua incorporação durante o processo de formação do sistema de microemulsão. Nesse contexto, a incorporação de substâncias lipofílicas, como o dilapiol, em sistemas microemulsificados do tipo O/A, pode ocorrer através da solubilização das moléculas ativas no filme interfacial surfactante ou no núcleo das gotículas de óleo, que possuem propriedades diferentes das meio aquoso externo.

Adicionou-se dilapiol como fase oleosa da microemulsão e do surfactante. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada e o sistema microemulsificado foi obtido pela técnica de emulsificação de energia aplicada durante o processo de centrifugação (GHOSH et al., 2013).

5.3.2 Caracterização físico-química

Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado para verificar se a microemulsão era compatível para administração oral e dérmica, porém, é uma ferramenta que também pode indicar alterações estruturais, ocorrência de reações químicas, como os processos de degradação e oxidação de seus componentes, perda de estabilidade do ME, sendo um parâmetro sensível no controle de qualidade dessas formulações.

O pH encontrado para a microemulsão foi de 5,62 e 5,71 e esses valores são compatíveis para uso dérmico e oral de acordo com (Strickley e Oliyai, 2007).

Condutividade elétrica

A determinação da condutividade elétrica de uma ME ajuda a elucidar o tipo de fase externa (contínua ou dispersante), sendo um parâmetro diretamente relacionado ao tipo de microestrutura apresentada pela formulação, revelando se os domínios contínuos apresentam características isolantes ou condutoras.

Assim, através dos valores de condutividade elétrica, é possível prever se o sistema é do tipo O/A ME. Isso se deve ao fato de que um EM do tipo O/A tem um efeito condutor. O valor de condutividade encontrado para microemulsões com dilapiol foi de $24,47 \pm 0,28 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $29,28 \pm 0,25 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, sendo esses valores sugestivos de um sistema com microestrutura tipo O/A (Naoui, et al. 2011).

Tamanho da gota e potencial Zeta

A análise da distribuição do tamanho das gotículas é considerada um dos parâmetros mais importantes para avaliar a estabilidade de sistemas dispersos, além de ser um fator essencial capaz de indicar aspectos prováveis da taxa e extensão da liberação e absorção de acordo com o tamanho do nanômetro de presença ou ausência (Wei, et al., 2012). A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi considerada uma ferramenta precisa e conveniente para estudar as propriedades internas das microemulsões, que é usada para determinar o tamanho das gotículas do sistema flutuando a intensidade da luz espalhada pelas gotículas suspensas, atuando em movimento browniano, obtendo assim a distribuição hidrodinâmica de seu tamanho (Li et al., 2010).

Para microemulsões com dilapiol a 5%, o tamanho médio das gotículas foi de 75,0 nm e para microemulsões com dilapiol a 10% foi obtido um valor de 167 nm e 15% de dilapiol com 173 nm.

Além do diâmetro, foi determinado o índice de polidispersividade (PDI) das formulações, nas quais foram encontrados 0,156, 0,152, 0,148. Essa medição leva em consideração o tamanho médio das gotículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variação da distribuição. Em uma escala de 0 a 1, PDI menor que 0,1 foi associado a um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de gotículas,

sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, altos valores de DPI sugerem uma distribuição de tamanho mais ampla ou polimodal (Gaumet et al., 2009).

O potencial zeta apresentou valores negativos em 21 mV, 24mV e 27,2 mV. O potencial Zeta desempenha um papel importante na determinação da estabilidade de sistemas dispersos e nas interações entre as gotículas presentes. Sistemas mais estáveis têm valores de potencial Zeta iguais ou superiores a 20 mV, uma vez que altas cargas superficiais causam a predominância de forças de repulsão entre as gotículas, superando a atratividade das forças de Van der Waals (Bose et al., 2013). Essa maior repulsa é importante para evitar o contato e a aglomeração das gotículas (Bhandari, 2013).

5.3.3 Concentração inibitória mínima

A atividade antimicrobiana do dilapiol foi verificada com o cálculo da concentração inibitória mínima (CIM), que pode ser encontrada na Tabela 2. As concentrações inibitórias mínimas no dilapiol e na microemulsão foram inferiores a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. faecalis*. Os resultados das CIMs na tabela 2 indicam a relevância clínica e a atividade antibacteriana intrínseca do dilapiol e a expansão dessa atividade do dilapiol inserido na microemulsão.

Tabela 6. Valores mínimos de concentração inibitória ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)

Amostra	<i>S. A.</i>	<i>E. F.</i>
PEG 8 e água	≥ 1024	≥ 1024
Dilapiol	512	512
Microemulsão com Dilapiol	128	256

Abreviações: PEG 8, Polietilenoglicol; S.A., *Staphylococcus aureus*; E. F., *Enterococcus faecalis*

A microdiluição utilizando os produtos de composição da formulação de microemulsão, PEG 8 e água, sem ação antibacteriana, foram observadas as concentrações utilizadas contra *S. aureus*, *E. faecalis*. Esses resultados mostram que esses produtos não têm efeito antibacteriano direto contra as cepas testadas e nas concentrações a que foram expostas nos testes e confirmam que o efeito antibacteriano é atribuído ao dilapiol (BRAZÃO et al., 2014).

5.3.4 Atividade moduladora

Modulações com os antibióticos ampicilina e vancomicina foram realizadas para avaliar uma possível interação entre eles e o dilapiol puro e inseridos em uma microemulsão, buscando estabelecer se há uma relação sinérgica ou antagônica, ou seja, se a ação antibiótica foi melhorada quando associado ao dilapiol. Os resultados da ação moduladora de dilapiol puro e inserido na microemulsão e a atividade com antibióticos contra as cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* são mostrados na Fig. 8.

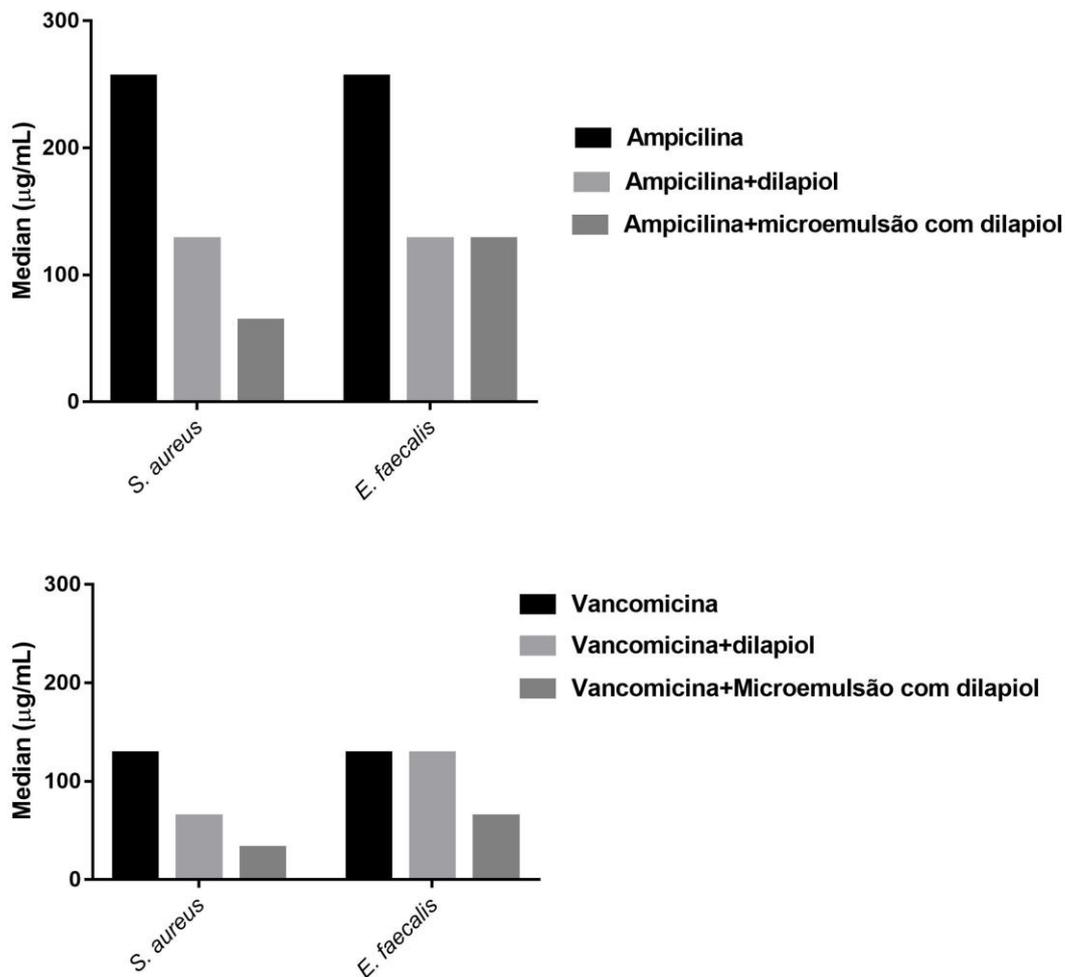


Figura 8. Efeito modulador do dilapiol inserido em microemulsão em associação com antibióticos: ampicilina (a) e vancomicina (b) em comparação com o efeito desses antibióticos isoladamente. Representados em $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.

Em associação com antibióticos, foi possível observar sinergismo do dilapiol puro e um potencial efeito sinérgico da microemulsão contra *S. aureus* e *E. faecalis* quando combinado com ampicilina e vancomicina Fig. 8a e 8b. Sinergismo é a combinação de fármacos ou compostos naturais, com capacidade de atuar em vários locais onde o microorganismo atua, melhorando a ação do produto agonista no teste (Coutinho et al.,

2008; Wagner et al., 2009). Toscan afirmou em seu estudo que os óleos essenciais e seus compostos podem atuar na célula microbiana, causando alterações na membrana celular, levando à perda de componentes celulares, causando a morte celular. As melhorias observadas no trabalho estão ligadas à microformulação do dilapiol, que pode proporcionar maior penetração da substância com antibióticos. Da mesma forma, as atividades antagônicas observadas são devidas a essas prováveis interações. No entanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar quais interações e, assim, possivelmente explicar o sinergismo e antagonismo sobre os medicamentos (Wagner et al., 2009).

5.4 Complexos de Inclusão do Dilapiol com ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD)

5.4.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Nos espectros feitos pela mistura física e suspensão de dilapiol com β -CD, as bandas características do dilapiol nas regiões 1463 e 1480 mostraram uma intensidade aparente, assim como as outras bandas presentes no espectro 1381, 1281, 1199 e 1044. Também é visível a complexação entre o óleo com β -CD, no método por malaxagem as visões 989 e 897 referentes ao dilapiol, as outras bandas também são visíveis sendo as de menor intensidade.

Os espectros de infravermelho de dilapiol com β -CD e HP- β -CD, os complexos de inclusão por métodos de mistura física, malaxagem e slurry são mostrados na Figura 9. Com base na literatura (Silverstein, 2015), o espectro de dilapiol apresenta 12 bandas principais: 2970 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} , em relação ao alongamento das vibrações da ligação CH; 1627 cm^{-1} , em relação a C=C, estendendo vibrações de cicloalcenos; 1463 e 1408 cm^{-1} , em relação à vibração da deformação assimétrica da ligação C-H do grupo metil; 1381 cm^{-1} , relativa à vibração da deformação simétrica da ligação C-H do grupo metil; 1281, 1199 e 1044 são as vibrações de deformação axial C-O dos fenóis; 989, 897, 834 e 788 cm^{-1} são as bandas mais importantes e fornecem mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos, relacionadas à vibração de deformação fora do plano C-H do anel.

O espectro do β -CD possui bandas características nas regiões de 3300 cm^{-1} (vibrações de alongamento de estiramento OH), 2925 cm^{-1} (vibrações de alongamento de ligação CH), 1151 cm^{-1} e 1023 cm^{-1} (vibrações de alongamento simétricas e assimétricas de o vínculo COC, respectivamente), conforme apresentado nos trabalhos de Abarca e colaboradores (2016), Passos et al., (2012) e Pinheiro et al., (2017).

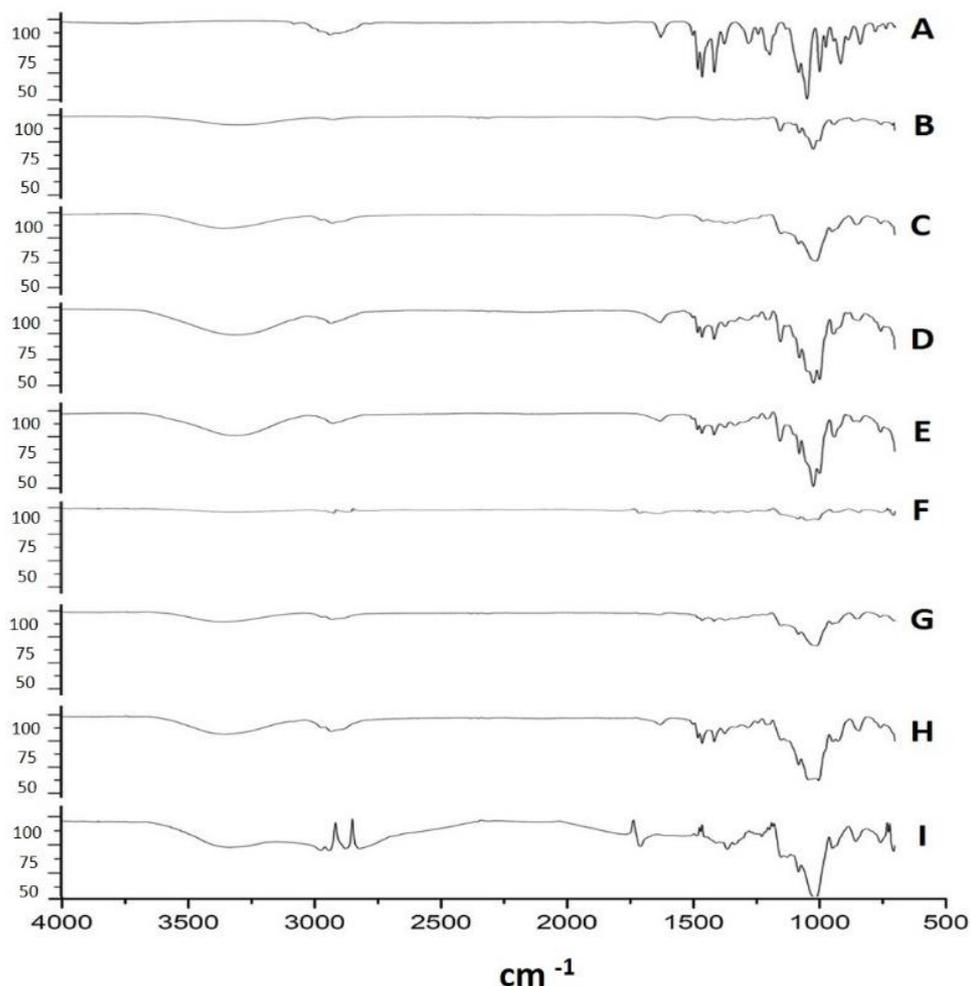


Figura 9. Espectros de FTIR do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* (A); β -CD (B); dilapiol com β -CD por PM (C); Dilapiol com β -CD por KND (D); dilapiol com β -CD por SL (E); HP- β -CD (F); dilapiol com HP- β -CD por PM (G); dilapiol com HP- β -CD por KND (H); Dilapiol com HP- β -CD por KND (I).

Nos espectros feitos pela mistura física e pasta de dilapiol com β -CD, as bandas características de dilapiol nas regiões 1463 e 1408 mostraram uma intensidade aparente,

assim como as outras bandas presentes no espectro 1381, 1281, 1199 e 1044, também é visível a complexação entre o óleo com β -CD, no método por slurry as visões 989 e 897 referentes ao óleo de dilapiol, sendo visíveis as outras bandas, sendo as de menor intensidade.

5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Em relação ao uso do MEV no estudo de complexos de inclusão, a modificação na morfologia é indicativa da formação do complexo de inclusão com ciclodextrinas (Zhu et al., 2016).

As fotomicrografias do β -CD e HP- β -CD, mistura física, amassamento e pasta com dilapiol são mostradas na figura 10. A morfologia da superfície do β -CD (figura A) apresenta partículas com estrutura cristalina em formato de paralelogramo, como observado por Bulani et al. (2016). A morfologia do HP- β -CD (Figura B) aparece como partículas esféricas amorfas, como relatado anteriormente por (Melo et al., 2016).

Na fotomicrografia da mistura física com teor de dilapiol, é possível observar as mesmas formas cristalinas encontradas na morfologia do β -CD (Figura C) e das partículas esféricas amorfas do HP- β -CD (Figura D), indicando que, por esse método, não há indicação de a formação de complexos de inclusão. É possível observar na fotomicrografia do amassado e da pasta (Figura E e G) com conteúdo de dilapiol uma pequena formação de agregados de tamanhos diferentes com uma superfície porosa e com um aspecto diferente da partícula β -CD, embora as partículas ainda mostrem amorfa características, são de forma irregular na amostra. E na fotomicrografia amassada e em pasta de HP- β -CD (Figura F e H) com dilapiol, é possível observar a aparência, a forma e o tamanho bastante diferentes da partícula HP- β -CD.

Como sugerido por Bulani et al. 2016, essas modificações na forma e no aspecto das partículas podem ser tomadas como uma prova da formação do complexo de inclusão com CD. Magalhães et al., 2020 observaram uma mudança na morfologia quando o óleo de *Euterpe oleracea* Mart foi complexado em β -CD e HP- β -CD. As morfologias do β -CD e HP- β -CD apresentaram diferenças com a oleorresina de *Copaifera multijuga* (Pinheiro et al., 2017). Os autores associaram as alterações morfológicas à formação do complexo de inclusão da ciclodextrina, bem como ao dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* com β -CD e HP- β -CD na figura 10.

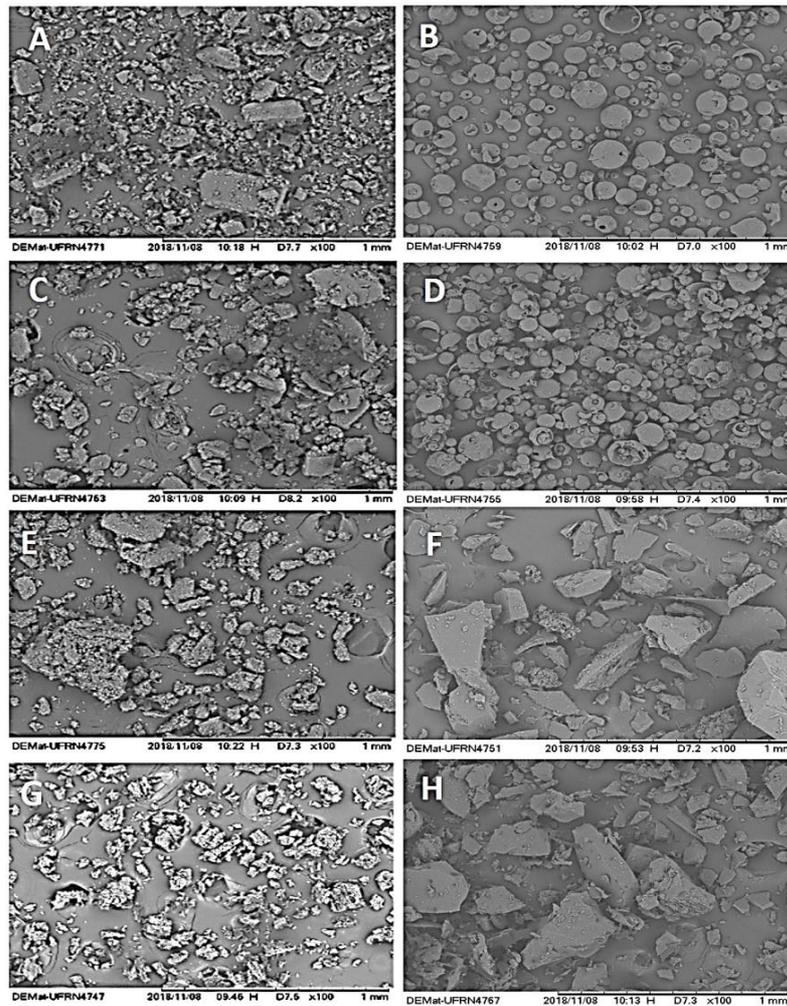


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura. β -CD (A); HP- β -CD (C); dilapiol com β -CD por PM (C); dilapiol com HP- β -CD por PM (D); dilapiol β -CD por KND (E); dilapiol com HP- β -CD por KND (F); dilapiol com β -CD por SL (G); dilapiol com HP- β -CD por SL (H).

5.4.3 Análise cristalográfica por raios X (DR-X)

Os difratogramas de CD (Figura 11) mostram as principais reflexões de cristal. O difratograma de PM e KND mostra um padrão cristalográfico semelhante apenas de β -CD. O padrão cristalográfico do CD submetido ao SL foi diferente daquele do β -CD sozinho; o método SL apresentou diferenças principalmente na faixa de 15 a 40°. Esses achados corroboram os de (Abarca et al., 2016), onde mostraram que a interação da ciclodextrina com os óleos essenciais causou alterações significativas no perfil de PXRD da ciclodextrina individual.

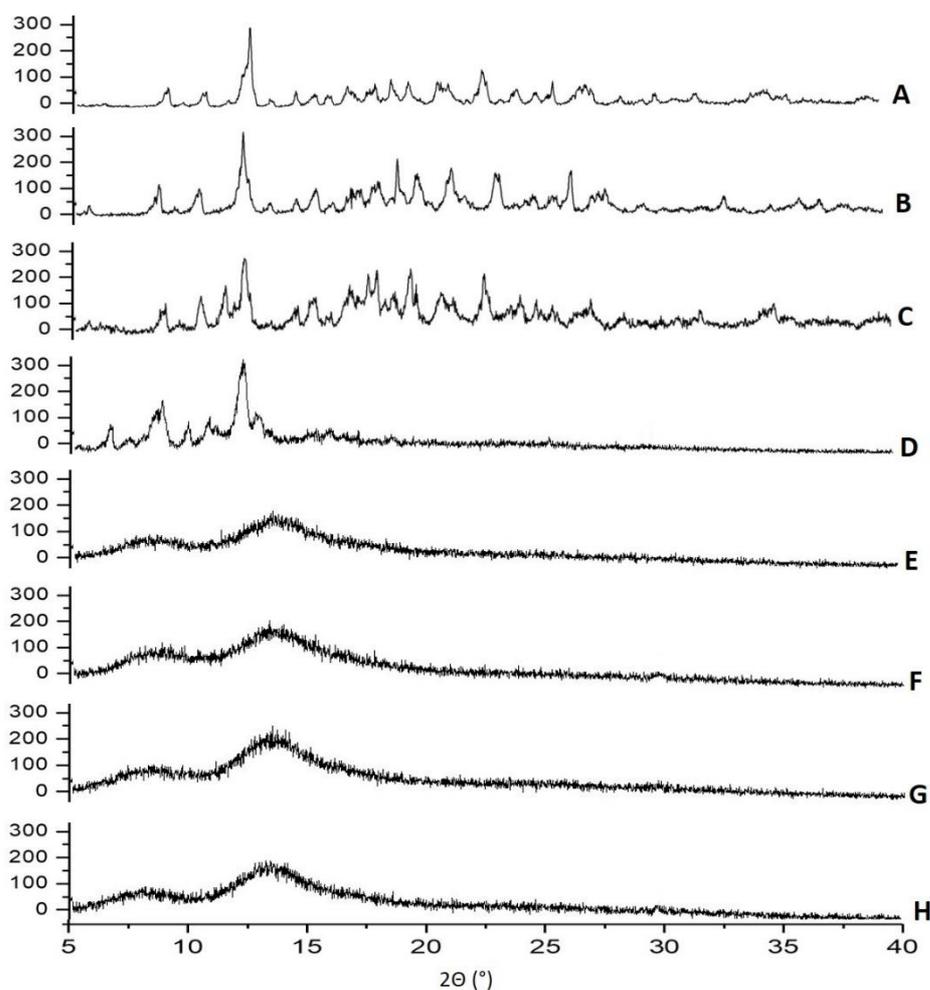


Figura 11. β -CD (A); dilapiol com β -CD por PM (B); dilapiol com β -CD por KND (C); dilapiol β -CD por SL (D); HP- β -CD (E); dilapiol com HP- β -CD por PM (F); dilapiol com HP- β -CD por KND (G); dilapiol com HP- β -CD por SL (H).

O difratograma HP- β -CD (Figura 3) é caracterizado por banda larga, em torno de 10 e 20 ° e é mais evidente, semelhante ao encontrado por (Medarevi'c et al., 2015; Magalhães et al., 2020). O HP- β -CD com dilapiol preparado por PM, KND e SL exibiram um ligeiro alongamento da banda em comparação com o HP- β -CD, mas mantiveram sua estrutura amorfa característica, como observado por MEV para complexos.

5.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)

Os resultados da análise TG / DTG são mostrados na Figura 12 e 13 e na Tabela 7. O dilapiol exibiu uma única perda de massa que pode estar associada à evaporação, volatilização ou pirólise de terpenos. O evento relacionado à perda de massa ocorreu na faixa de 200 a 400 °C, com uma perda de massa de 95,11% . O β -CD exibiu perdas de

massa de 7,28%, 79,52% nas faixas de 40 a 200 e 200 a 400 ° C, respectivamente, que provavelmente foram associadas à liberação de moléculas de água de superfície seguida de degradação (Menezes et al. , 2016). As curvas dos complexos dilapiol- β -CD preparadas por PM, KND e SL apresentaram perdas de massa de 40 a 200 ° C de 20,35%, 20,17% e 8,13%, respectivamente, sugerindo perda de água pela ciclodextrina, uma vez que o dilapiol não perdeu massa.

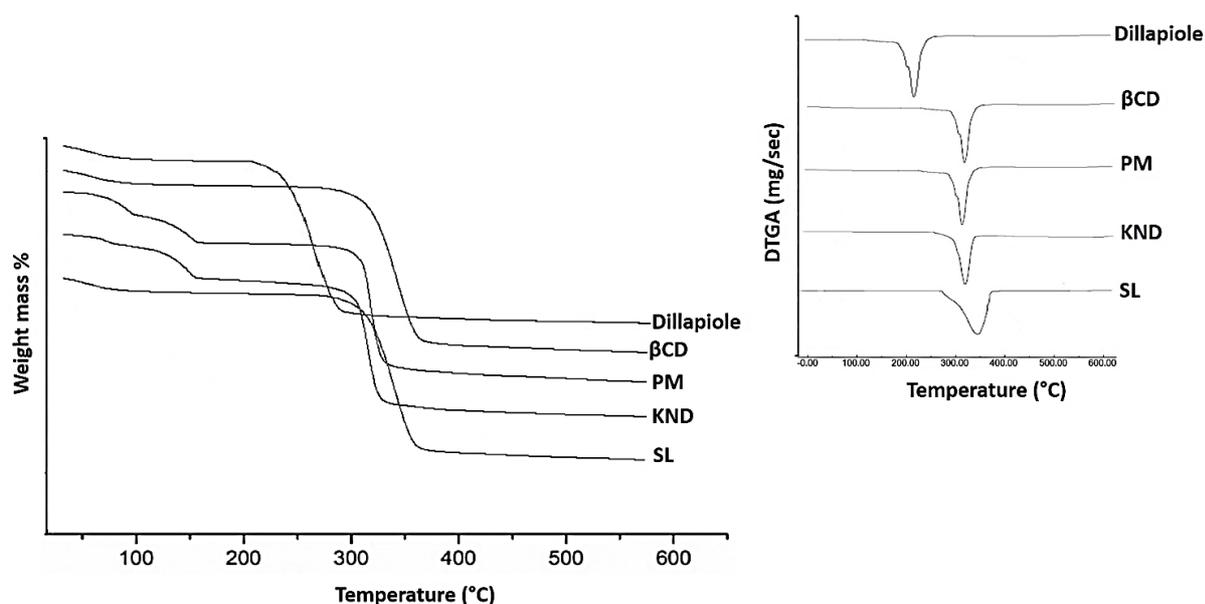


Figura 12. Termogravimetria dos complexos de inclusão de β -CD com dilapiol.

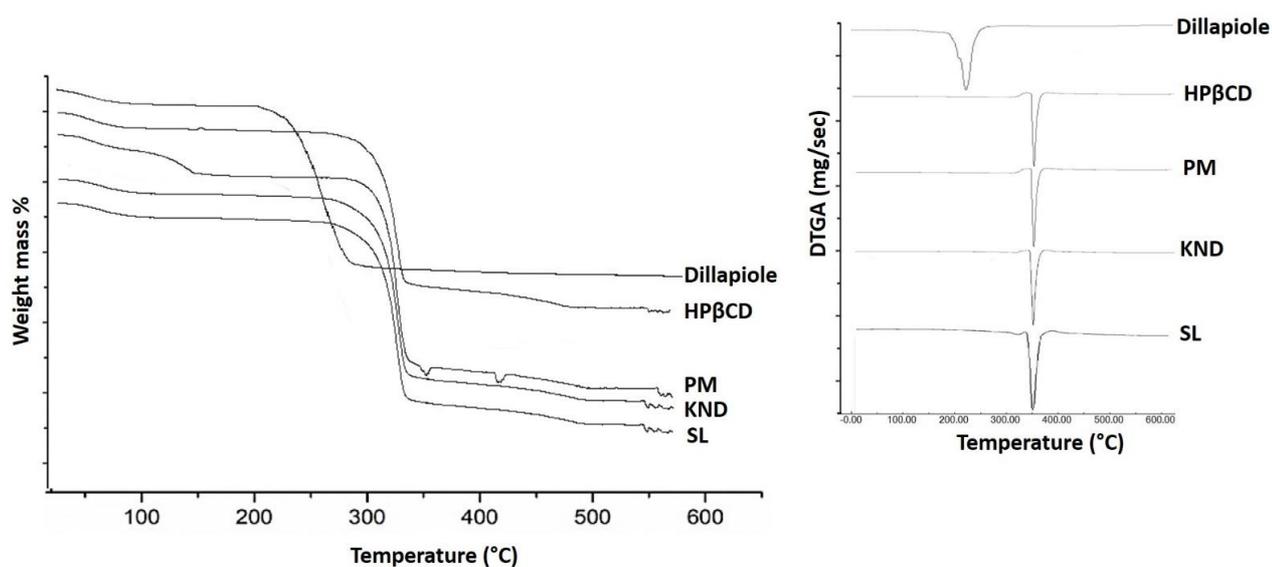


Figura 13. Termogravimetria dos complexos de inclusão de HP- β -CD com dilapiol.

Tabela 7. Perdas de massa (%), faixas de temperatura de 25-200 °C, 200-400 °C e 400-600 °C

Amostra	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Δm_3 (%)
	25-200 °C	200-400 °C	400-600 °C
Dilapiol	-	95.11	0.55
β -CD	7.28	79.52	0.54
PM (β -CD)	20.35	75.47	0.55
KND (β -CD)	20.17	72.33	0.56
SL (β -CD)	8.13	74.55	0.54
HP- β -CD	8.24	80.46	2.07
PM (HP- β -CD)	18.09	74.32	2.18
KND (HP- β -CD)	8.06	72.07	2.09
SL (HP- β -CD)	8.04	70.13	2.11

A curva TG / DTG do HP- β -CD (Figura 13) revelou perda de massa de 8,24% na faixa de 40 a 200 °C, associada à liberação de moléculas de água da superfície do HP- β -CD, seguida pela degradação da amostra com uma perda de 80,46% na faixa de 200 a 400 °C. Enquanto o complexo dilapiol-HP- β -CD preparado por PM, KND e SL (Figura 13) apresentou uma perda de massa de 18,09%, 8,06% e 8,04%, e o dilapiol sem perda de massa de 40 a 200 °C. Assim, a formação dos complexos dilapiol- β -CD e dilapiol-HP- β -CD foi evidenciada para ambas as metodologias.

5.4.5 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

O DSC é uma poderosa ferramenta analítica para identificar interações entre medicamentos e CDs. Como regra geral, alterações nas curvas DSC, como redução ou ampliação de picos, bem como mudança para temperaturas mais baixas, são uma consequência da complexação entre a droga e o CD (Araújo et al., 2008; Mura et al., 2015). O dilapiol mostra um pico endotérmico a 230,28 °C (Figura 14 e 15) correspondente à sua volatilização. A curva DSC para β -CD mostra dois picos endotérmicos. O primeiro, dentro da faixa de temperatura de 155 °C, é devido à liberação de moléculas de água de sua superfície. O segundo pico endotérmico aparece na faixa de temperatura de 320 a 360 °C (Figura 14), que está associada à decomposição do β -CD.

Em relação às curvas DSC para os sistemas dilapiol / β -CD obtidos por PM, KND e SL, observa-se um primeiro evento associado à liberação de moléculas de água da cavidade β -CD na faixa de 100 a 200 °C e uma segunda endotérmica também foi observado pico a 320-360 °C, sendo mais aparente em KND e SL (Figura 14). A curva DSC para dilapiol/ β -

CD obtida por PM, KND, SL mostra o desaparecimento do evento relacionado à volatilização do dilapiol, indicando interação entre dilapiol e β -CD.

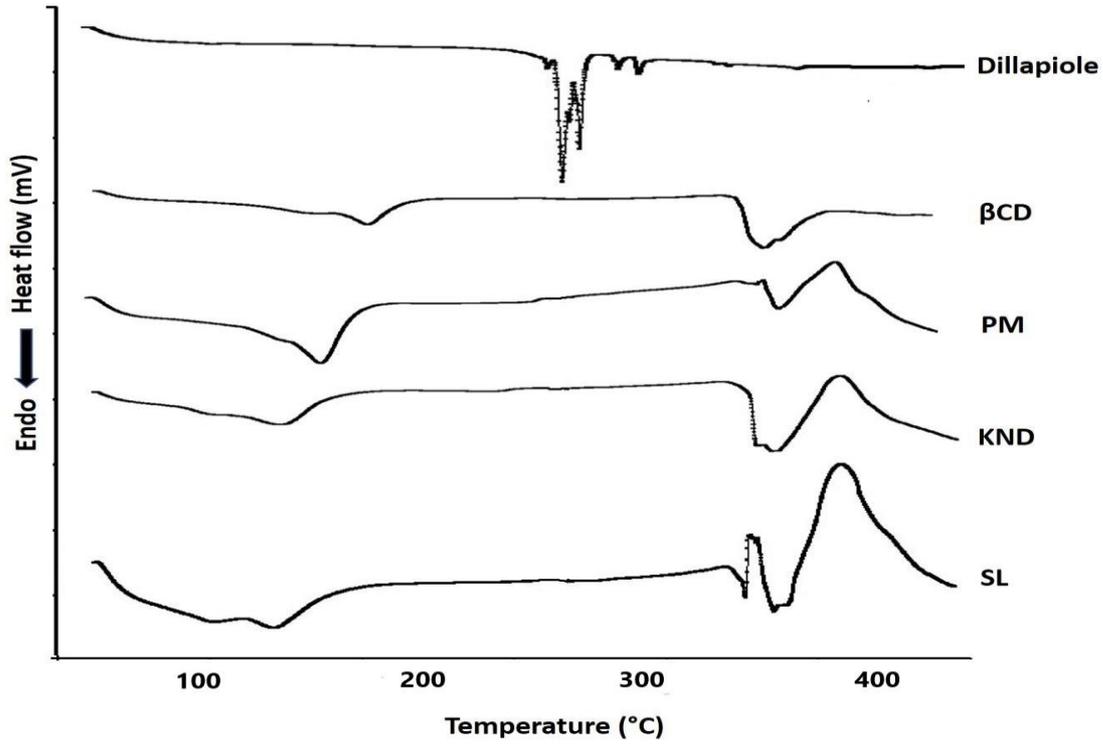


Figura 14. Curvas de DSC dos complexos de inclusão do dilapiol de óleo essencial de *P. aduncum* com β -ciclodextrina

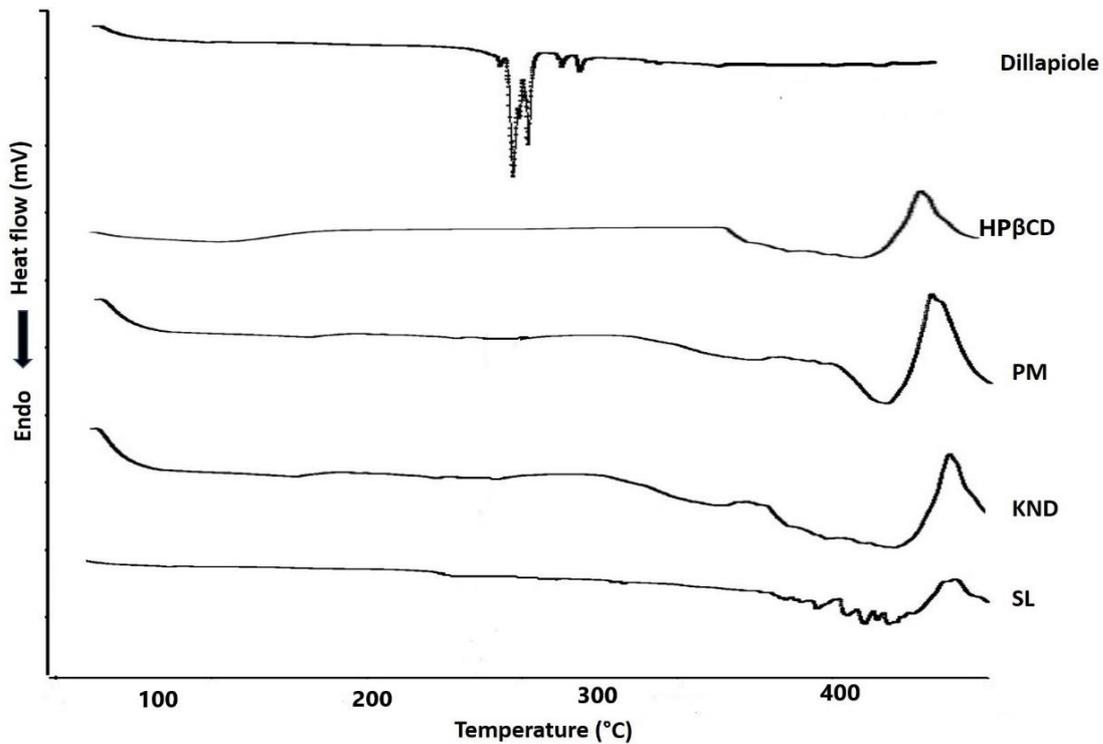


Figura 15. Curvas de DSC dos complexos de inclusão do dilapiol de óleo essencial de *P. aduncum* com HP- β -ciclodextrina.

A curva DSC para HP- β -CD (figura 15) mostra um pico endotérmico: 350-470 °C relacionado à sua decomposição. Em relação aos sistemas dilapiol/HP- β -CD, o evento térmico relacionado à volatilização do dilapiol desaparece, independentemente do método de preparação, indicando interação entre o dilapiol e o HP- β -CD.

5.4.6 Concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana do dilapiol foi verificada através do cálculo da concentração inibitória mínima (CIM), que pode ser encontrada na Tabela 8. As concentrações inibitórias mínimas no dilapiol foram de 512 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e *E. faecalis*. Os resultados das CIMs na Tabela 8 indicam a relevância clínica e a atividade antibacteriana intrínseca do dilapiol e a expansão dessa atividade inserido em complexos de inclusão com ciclodextrina. Esses resultados contribuem para a confirmação do efeito antibacteriano atribuído ao dilapiol (Brazão et al., 2014).

Tabela 8. Valores da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

AMOSTRA	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Dilapiol	512	512
Dilapiol- β -CD (MF)	256	512
Dilapiol- β -CD (KND)	256	256
Dilapiol- β -CD (SL)	128	256
AMOSTRA	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Dilapiol	512	512
Dilapiol-HP- β -CD (MF)	256	256
Dilapiol-HP- β -CD (KND)	128	256
Dilapiol-HP- β -CD (SL)	64	128

5.4.7 Atividade moduladora

O teste de modulação medicamentosa foi realizado com dilapiol e seus complexos de inclusão com ciclodextrinas e antibióticos comumente prescritos na prática clínica para o tratamento de doenças hospitalares, a fim de estabelecer possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos. Dois antibióticos sugeridos por (CLSI., 2013) foram utilizados contra cada microrganismo em estudo: Ampicilina e Vancomicina (AMP e VAN 1024 $\mu\text{g/mL}$) contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados da atividade de modulação contra *S. aureus* (figura 16) mostraram uma diminuição na AMP CIM de 256 para 128 $\mu\text{g/mL}$ quando este antibiótico foi usado em combinação com dilapiol e dilapiol- β -CD preparado por PM e pelos métodos de KND e SL reduziu a CIM diminuiu para 64 $\mu\text{g/mL}$, destacando um efeito sinérgico muito relevante. Na combinação de AMP e complexo de inclusão de dilapiol com HP- β -CD, a diminuição foi de 128 $\mu\text{g/mL}$ pelo método PM, 64 $\mu\text{g/mL}$ por KND e pelo método SL a diminuição da CIM foi de 32 $\mu\text{g/mL}$, sendo SL CIM de menor concentração, destacando o excelente efeito modulador do antibiótico (figura 16).

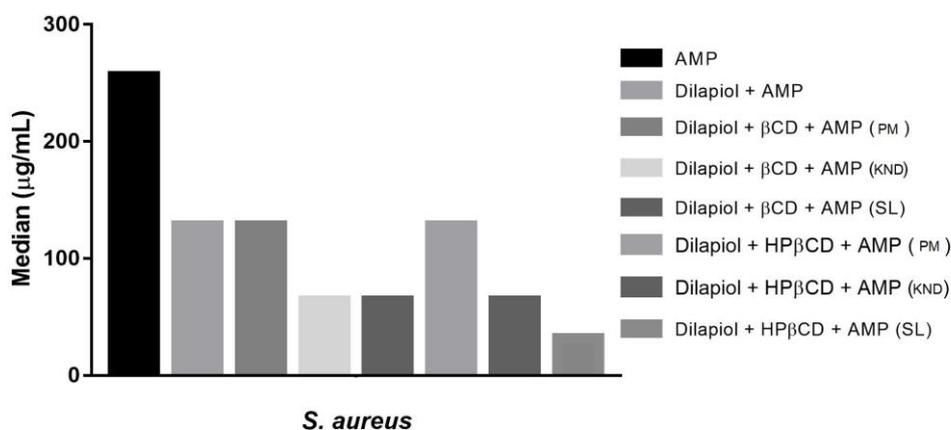


Figura 16. Efeito modulador do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* e seus complexos de inclusão com β -CD e HP- β -CD com o antibiótico ampicilina para a bactéria *S. aureus*.

Para o antibiótico vancomicina, os resultados da atividade moduladora contra *S. aureus* (Figura 17) mostraram uma diminuição na CIM da VAN de 128 para 64 $\mu\text{g/mL}$. Quando este antibiótico é usado com dilapiol complexado com β -CD pelo método PM. Usando os métodos KND e SL, a diminuição da CIM foi de 32 $\mu\text{g/mL}$. Os complexos de inclusão de dilapiol pelo HP- β -CD também apresentaram excelentes reduções na CIM, enquanto pelo método PM a CIM diminuiu 64 $\mu\text{g/mL}$, KND 32 $\mu\text{g/mL}$ e pelo método Slurry, a redução da CIM foi muito significativa em 16 $\mu\text{g/mL}$.

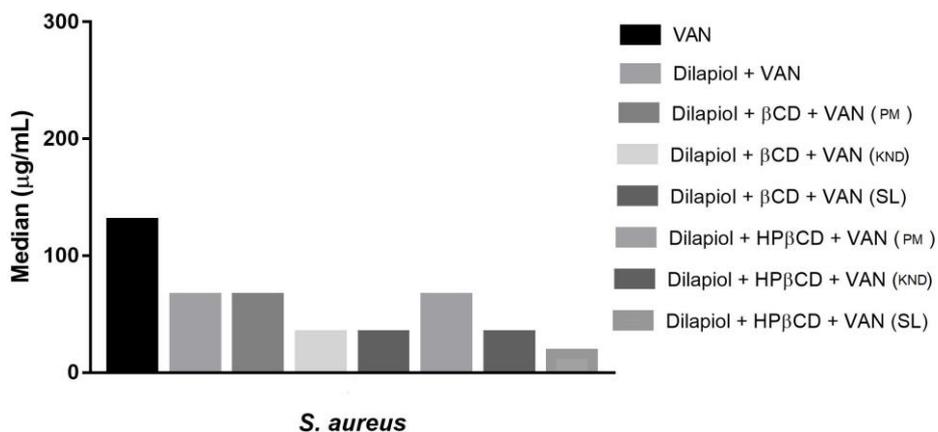


Figura 17. Efeito modulador do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* e seus complexos de inclusão com β-CD e HP-β-CD com o antibiótico vancomicina para a bactéria *S. aureus*.

Os resultados da atividade de modulação contra *E. faecalis* (Figura 18) mostraram uma diminuição na AMP MIC de 256 a 128 µg/mL quando este antibiótico foi usado em combinação com dilapiol e dilapiol-β-CD preparado por PM, KND e SL. Na combinação de AMP e o complexo de inclusão de dilapiol com HP-β-CD, a diminuição foi de 128 µg/mL pelo método PM, 64 µg/mL por KND e SL.

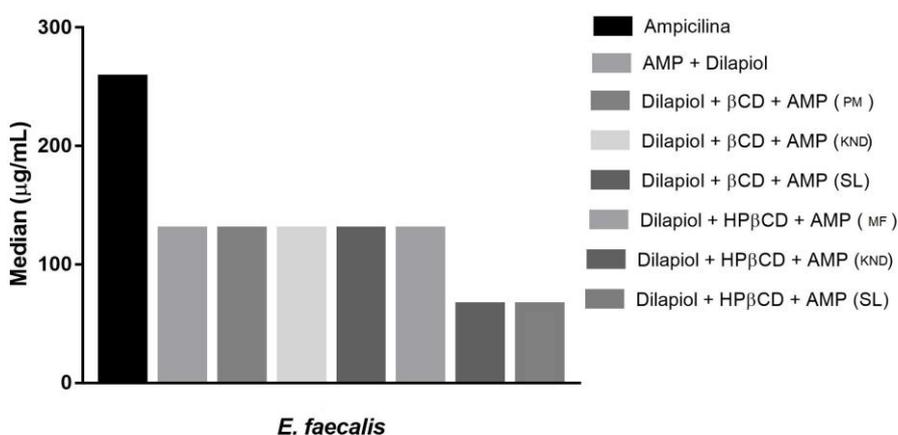


Figura 18. Efeito modulador do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* e seus complexos de inclusão com β-CD e HP-β-CD com o antibiótico ampicilina para a bactéria *E. faecalis*.

Usando os métodos KND e SL, a diminuição da CIM foi de 32 µg/mL. E no método SL, a redução na CIM da VAN foi de 32 µg/mL. Os complexos de inclusão de dilapiol por HP-β-CD também apresentaram excelentes reduções na CIM, enquanto pelo método PM a

CIM diminuiu 64 $\mu\text{g/mL}$, KND 32 $\mu\text{g/mL}$ e pelo método Slurry, a redução da CIM foi muito significativa em 16 $\mu\text{g/mL}$ (figura 19).

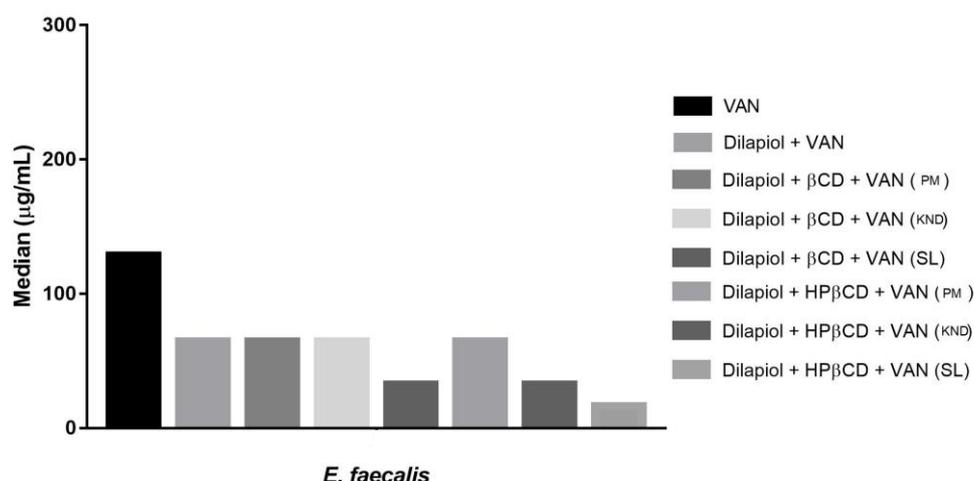


Figura 19. Efeito modulador do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* e seus complexos de inclusão com $\beta\text{-CD}$ e HP- $\beta\text{-CD}$ com o antibiótico vancomicina para a bactéria *E. faecalis*.

A atividade moduladora de medicamentos apoia uma terapia combinada que nem sempre melhora os resultados clínicos, mas é capaz de diminuir as chances de resistência bacteriana a vários medicamentos, o que é um problema crescente (Walkenhorst et al., 2016).

Em associação com antibióticos, foi possível observar sinergismo do dilapiol e um potencial efeito sinérgico dos complexos de inclusão contra *S. aureus* e *E. faecalis* quando combinados com ampicilina e vancomicina. Sinergismo é a combinação de fármacos ou compostos naturais, com capacidade de atuar em vários locais onde o microrganismo atua, melhorando a ação do produto agonista no teste (Coutinho et al., 2008; Wagner et al., 2009). Wagner et al., (2009) declararam em seu estudo que os óleos essenciais e seus compostos podem atuar na célula microbiana, causando alterações na membrana celular, levando à perda de componentes celulares, causando a morte celular. As melhorias observadas no trabalho estão ligadas ao complexo de inclusão do dilapiol, que pode proporcionar maior penetração da substância com antibióticos.

5.5 Nanoformulações com Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*

Validação analítica e bioanalítica de dilapiol (DIL)

A validação analítica e bioanalítica do dilapiol foi realizada em condições otimizadas de 100 μL de amostra, 100 $^{\circ}\text{C}$ e 10 min de tempo de extração. Para fins bioanalíticos, a validação foi realizada com matrizes PES e RF.

Para avaliar a seletividade do método, os cromatogramas com matrizes em branco sem dilapiol (fitas da fita adesiva contendo estrato córneo, epiderme, derme e fluido receptor) foram comparados com uma solução de referência metanólica de óleo essencial de *P. aduncum* (OEPA) com dilapiol a 8,00 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Como apresentado na Fig. 20, não foram observadas interferências relacionadas à matriz no pico do tempo de retenção do dilapiol (cerca de 6,5 min). Nesses termos, o método HS-GC-FID provou quantificar dilapiol seletivamente.

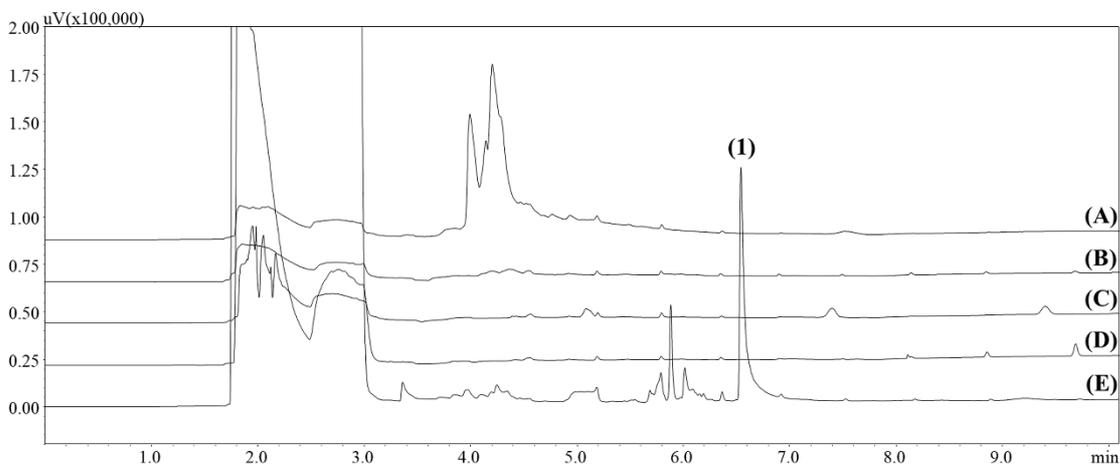


Figura 20. Seletividade de (A) fitas contendo estrato córneo suíno, (B) epiderme, (C) derme, (D) fluido receptor e (E) a solução de referência de OEPA com (1) dilapiol a 8,00 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Os resultados da linearidade são mostrados na Tabela 9 e os coeficientes de determinação indicaram que o método é linear para matrizes de PES e RF e solução metanólica dentro da faixa de 0,80 - 16,01 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O LOD e LOQ foram calculados a

partir da curva de calibração, sendo, respectivamente, 0,27 e 0,8 µg / mL para a solução metanólica, 1,12 e 2,0 µg / mL para PES e 0,65 e 0,8 µg / mL para FR (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para dilapiol de diferentes matrizes.

Matriz	Alcance	Equação	r ²	LOD	LOQ
Referência*	0.80 – 16.01	$y = 59984x + 9432.5$	0.9957	0.27	0.80
PES	2.00 – 16.01	$y = 17278x - 11798$	0.9947	1.12	2.00
RF	0.80 – 16.01	$y = 27684x - 130.59$	0.9981	0.65	0.80

* Referências relacionadas à solução de referência, aplicada para validação analítica.

r²: coeficiente de determinação; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação;

PES: pele de orelha suína; RF: fluido receptor.

Faixa, LOD e LOQ expressos em µg / mL.

A precisão intra-dia das matrizes PES e RF e solução metanólica para dilapiol exibiu um desvio padrão relativo (RSD%) entre 0,99 - 18,04%, enquanto a precisão inter-dia apresentou valores de% RSD em torno de 2,44 - 15,61% (Tabela 10). Além disso, a precisão do método foi avaliada mostrando valores entre 2,54 - 15,65% para as concentrações e matrizes testadas.

Em relação à recuperação de dilapiol de matrizes (PES e FR), os resultados foram entre 97,57 - 105,43% em ambas as matrizes nas concentrações testadas (Tabela 10). Esses resultados mostraram uma alta recuperação (> 97%) com baixo RSD%, confirmando a recuperação eficiente de dilapiol das matrizes após o procedimento de extração, permitindo a quantificação desse composto em matrizes complexas.

O efeito de transição foi avaliado juntamente com a precisão inter-dias, uma vez que a principal intenção era avaliar as interferências em uma amostra em branco (Guideline on bioanalytical method validation, 2012; Monteiro et al., 2014). Após solução metanólica e matrizes pontiagudas (PES e RF) na maior concentração da curva de calibração, duas

amostras em branco foram injetadas e o sinal de pico do dilapiol foi investigado. O pico de sinal do dilapiol nas duas amostras em branco foi inferior a 20% do limite de quantificação (LOQ), sugerindo baixa interferência e possibilitando a randomização de análises com diferentes concentrações (Guideline on bioanalytical method validation, 2012).

Os parâmetros investigados acima estão de acordo com as diretrizes oficiais, indicando que a metodologia do HS-GC-FID é aceitável e apropriada para quantificar o dilapiol da solução metanólica e matrizes complexas (PES e RF).

Tabela 10. Resultados para precisão intra-dia e inter-dia, exatidão e recuperação do dilapiol de diferentes matrizes.

Matriz	Concentração nominal (µg/mL)	Precisão intra-dia (RSD%)			Precisão inter-dia (RSD%)	Precisão (RSD (%))	Recuperação RE% (RSD%)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3			
Referência*	0.80	2.44	2.55	2.85	2.44	2.54	-
	8.00	4.07	2.00	0.99	3.86	3.70	-
	16.01	3.09	4.97	4.83	4.73	4.69	-
PES	2.00	1.35	9.74	5.98	9.12	9.09	105.43 (5.31)
	8.00	12.78	4.04	7.48	8.52	8.54	97.57 (1.64)
	16.01	13.15	8.17	5.36	8.76	8.76	104.45 (2.20)
RF	0.80	4.93	18.04	17.02	15.61	15.65	102.14 (9.93)
	8.00	5.52	16.53	10.72	12.21	11.39	101.90 (3.62)
	16.01	2.73	2.27	9.30	5.80	5.82	99.26 (2.02)

* Referências relacionadas à solução de referência, aplicada para validação analítica.

PES: pele de orelha suína; RF: fluido receptor.

% RSD: porcentagem de desvio padrão relativo.

5.5.1 Caracterização de nanoemulsões e transportadores lipídicos nanoestruturados contendo Dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*

NE e NLC carregados com dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* foram preparados por homogeneização a alta pressão devido a vantagens relacionadas ao menor tempo de produção e à ausência de solventes orgânicos (Muller et al., 2011; Vitorino et al., 2013). Ambos os nanocarreadores carregados com dilapiol apresentaram aparência leitosa e opaca, odor amadeirado, com tamanho de gota na faixa nanométrica (em torno de 130 nm)

(Fig.21). Em seguida, os nanocarreadores foram espessados pelo polímero de hidroxietilcelulose, a fim de proporcionar maior aderência e viscosidade para administração tópica (Buwalda et al., 2014; Barradas et al., 2018; McClements et al., 2018). HNE e HNLC apresentaram tamanhos de gotículas de $134,31 \pm 30,14$ e $118,98 \pm 8,46$ nm, respectivamente. As formulações de tamanho nanométrico têm vantagens relacionadas à ampla absorção e aumento da permeabilidade, além de minimizar efeitos adversos e reações tóxicas (Jaiswal et al., 2015; Singh et al., 2017).

Além disso, foi observado um índice de polidispersividade estreito em torno de 0,3 para formulações. NE e NLC apresentaram PDI cerca de $0,20 \pm 0,01$ e $0,19 \pm 0,06$, respectivamente, enquanto HNE e HNLC apresentaram PDI de $0,28 \pm 0,06$ e $0,21 \pm 0,03$, respectivamente (fig. 21). Os valores mais altos de PDI encontrados em nanocarreadores espessados com hidrogéis podem estar relacionados ao inchaço do polímero na fase contínua, impactando nas medidas de dispersão (Alam et al., 2012; Sutradhar et al., 2013). Em termos gerais, o índice de polidispersividade estreita ($<0,3$) atribui monodispersão e uniformidade às nanoformulações, compatíveis com o sistema coloidal uniforme (Chetoni et al., 2016; Gundel et al., 2018).

Os resultados do potencial zeta para NE, NLC, HNE e HNLC foram, respectivamente, $-46,10 \pm 0,37$, $-40,91 \pm 12,42$, $-38,31 \pm 2,38$ e $-36,60 \pm 4,80$ mV (Fig. 21). O potencial zeta negativo das formulações pode ser atribuído ao surfactante não-iônico Span 80® (Gundel et al., 2018). Além disso, o potencial zeta, com altos valores no módulo ($>|30|$), é conhecido por fornecer repulsão eletrostática e, portanto, melhor estabilidade dos nanocarreadores (Nasseri et al., 2016).

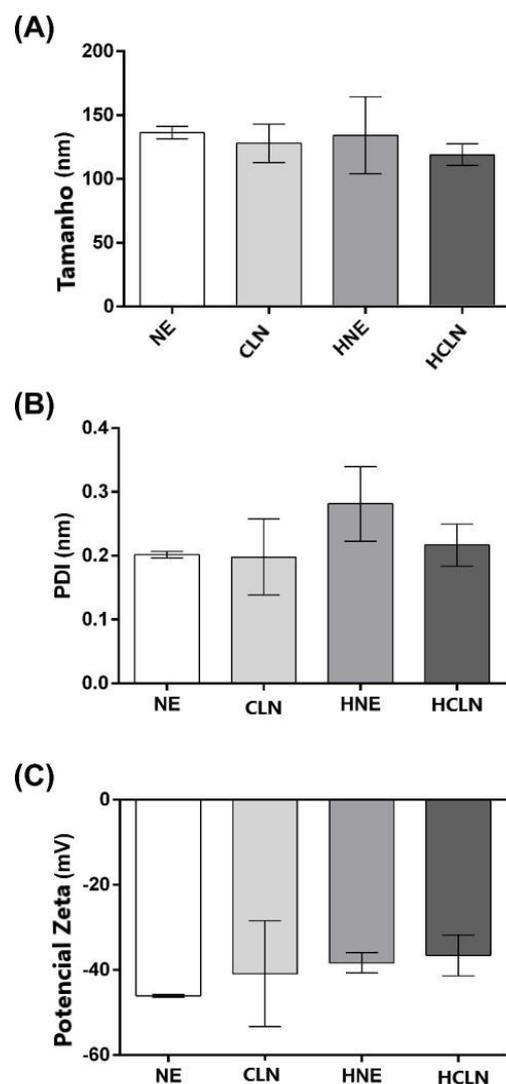


Figura 21. Resultados para tamanho de partícula (nm) (A), índice de polidispersividade (B) e potencial zeta (mV) (C) para NE, CLN, HNE e HCLN após a preparação. Dados apresentados como média \pm DP (n = 3).

NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HNE: nanoemulsão espessada com hidrogel de hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

O conteúdo de dilapiol de NE, CLN e hidrogéis derivados foi avaliado após a preparação e os resultados são apresentados na Fig. 22. O conteúdo para as formulações

desenvolvidas estava entre 89,75 - 115,39%. O menor teor de CLN e seu hidrogel derivado (89,75 e 100,52%, respectivamente), em comparação com NE e HNE (115,39 e 111,61%, respectivamente), pode estar relacionado ao processo de produção que envolveu aquecimento, o que pode promover a volatilização da do óleo durante a fabricação, impactando no conteúdo do dilapiol.

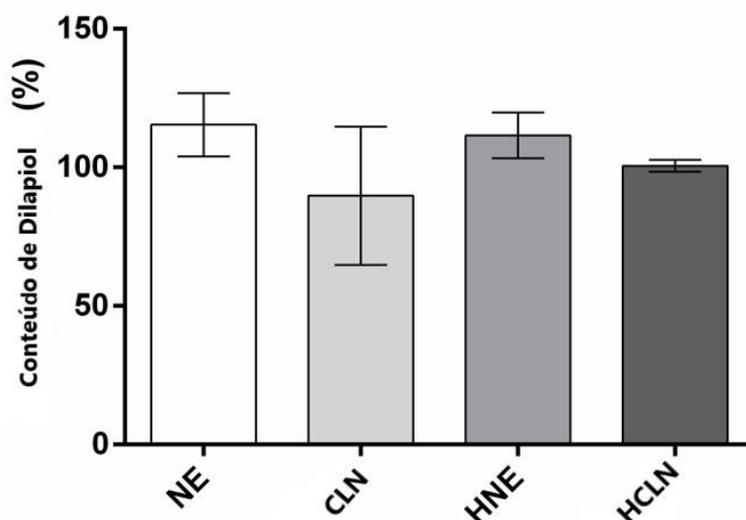


Fig. 22. Teor de dilapiol (%) para NE, NLC, HNE e HNLC após a preparação. Dados apresentados como média \pm DP (n = 3).

NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HNE: nanoemulsão espessada com hidrogel de hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

O tamanho e a morfologia do NE, CLN, HNE e HCLN contendo óleo essencial de *P. aduncum* foram realizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão e as imagens são compiladas na Fig. 23. As micrografias revelaram tamanhos de partícula comparáveis aos obtidos pela análise DLS em torno de 130 nm, indicando estrutura esférica, homogênea e lisa (Hu et al., 2016).

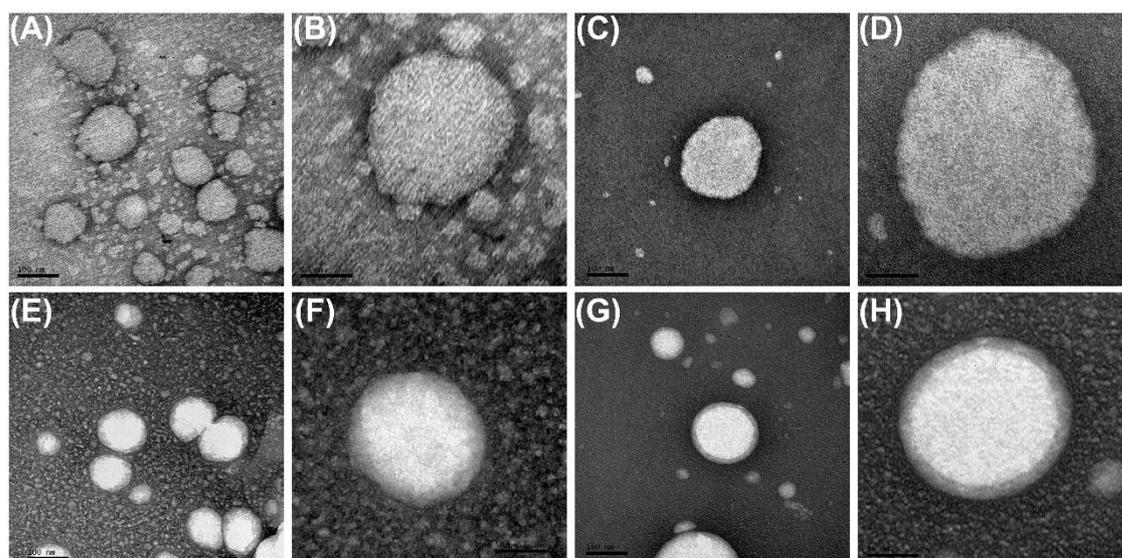


Fig. 23. Micrografias TEM com ampliação de 200 K (A, C, E, G) e 500 K (B, D, F, H) de NE (A-B), NLC (C-D), HNE (E-F) e HNLC (G-H).

TEM: microscopia eletrônica de transmissão; NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HNE: nanoemulsão espessada em hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

5.5.2 Comportamento reológico de hidrogéis contendo dilapiol do óleo essencial *P. aduncum*

A nanoemulsão espessada com hidrogel de hidroxietilcelulose e o carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel de hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum* foram caracterizados por seu perfil reológico e os resultados são mostrados na Fig. 24 e Tabela 11.

Conforme apresentado nos reogramas, o espessamento da nanoemulsão e do carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum* com o polímero derivado de celulose diminuiu a viscosidade do hidrogel quando comparado com apenas o hidrogel de hidroxietilcelulose, o que pode estar relacionado à maior viscosidade e densidade da água (Fig. 24A). Além disso, o HCLN apresentou uma viscosidade mais alta

em comparação com o HNE, principalmente relacionada à presença de um lipídio sólido no núcleo oleoso do HCLN (Fig. 24B).

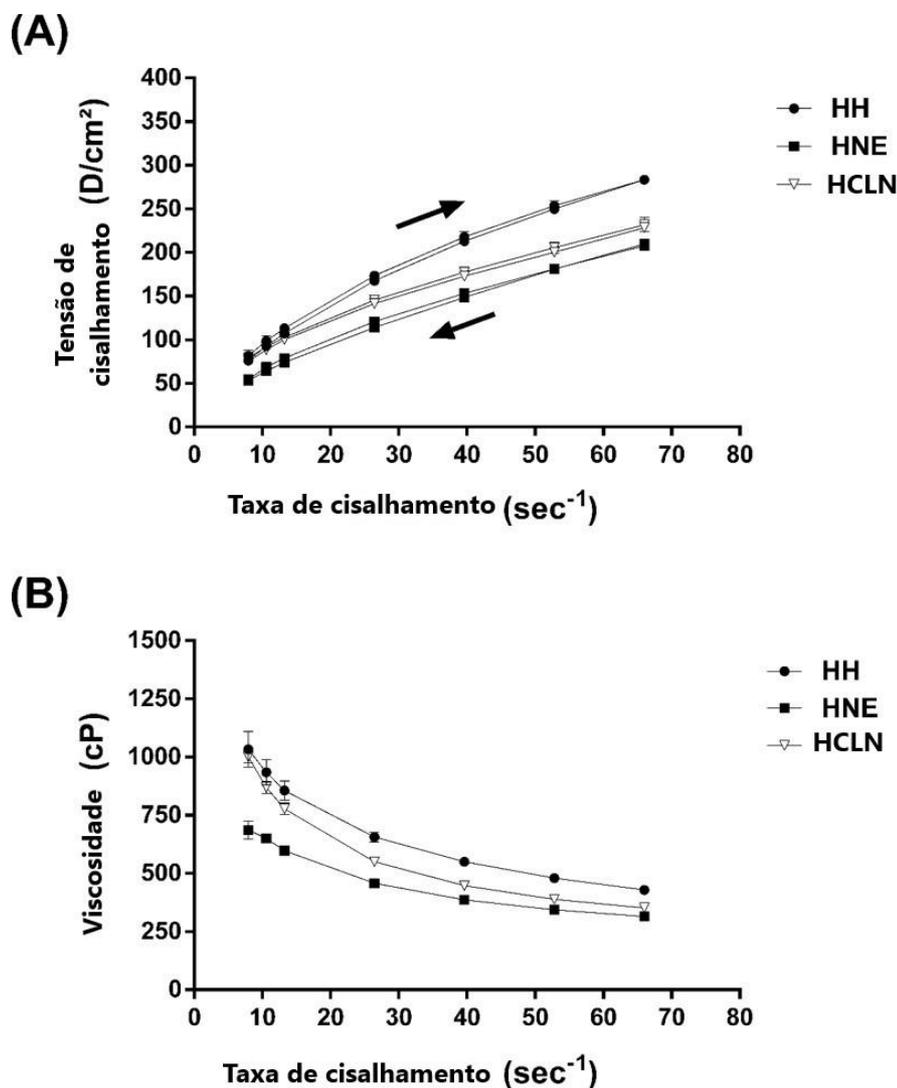


Fig. 24. Reogramas contendo curvas ascendentes e descendentes do hidrogel de hidroxietilcelulose em branco sem nanoemulsão ou carreador lipídico nanoestruturado (HH), nanoemulsão espessada com hidrogel com hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum* (HNE) Carreador lipídico nanoestruturado com hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*. Os resultados são apresentados como média \pm DP ($n = 3$).

Os reogramas para hidrogéis apresentados na Fig. 24 mostraram um comportamento pseudoplástico não newtoniano, uma vez que a viscosidade não é constante e diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Para confirmar o comportamento reológico das formulações, diferentes modelos matemáticos (Bingham, Ostwald, Casson e Herschel-Bulkley) foram aplicados aos dados para prever o comportamento do fluxo (Tabela 11). O modelo de melhor ajuste selecionado para todas as formulações foi o modelo de fluxo de Ostwald baseado no valor do coeficiente de determinação (r^2). A partir da equação de Ostwald, o valor do índice de fluxo para HNE e HCLN foi obtido a partir da inclinação da equação, sendo, respectivamente, 0,62 e 0,503, inferiores a 1, confirmando que ambos os hidrogéis possuem fluxo não newtoniano com comportamento pseudoplástico (Tabela 11) (Aulton et al.,2001). Além disso, observou-se um leve comportamento tixotrópico para HH, HNE e HCLN, pois as curvas de fluxo ascendente e descendente não se sobrepõem, estando relacionadas a uma diminuição da viscosidade ao longo do tempo sob um cisalhamento constante (viscosidade dependente do tempo).

O fluxo não newtoniano com comportamento pseudoplástico dos hidrogéis contendo óleo essencial de *P. aduncum* é digno de nota em produtos farmacêuticos. A alta viscosidade e o comportamento tixotrópico das formulações promovem o fluxo livre ao sair da embalagem e espalhar sobre a pele, reduzir a mobilidade da fase dispersa e atrasar os eventos de instabilidade (Aulton et al.,2001; Borghetti et al., 2007).

Tabela 11. Coeficientes de determinação (r^2) para modelos de fluxo reológico com base na taxa de cisalhamento e nas curvas de tensão de cisalhamento dos hidrogéis.

Formulação	Coeficiente de determinação por modelo (r^2)			
	Bingham	Ostwald	Casson	Herschel-Bulkley
HH	0.98	0.9988	0.9919	0.9667
HNE	0.9868	0.9983	0.9941	0.9791

HCLN	0.9868	0.9999	0.9965	0.9718
------	--------	--------	--------	--------

HH: hidrogel de hidroxietilcelulose em branco sem nanoemulsão ou veículo lipídico nanoestruturado; HNE: nanoemulsão espessada com hidrogel de hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidroxietilcelulose com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

5.5.3 Medições de bioadesão

Para os fins deste ensaio, a pele da orelha de porco foi usada como tecido biológico. Os estudos de bioadesão para NE, CLN, HNE e HCLN são apresentados como força de deslocamento e trabalho de adesão, conforme compilado na Fig. 25. O trabalho de adesão (mN.mm), uma medida direta de bioadesão nos tecidos, foi calculado a partir de a área sob a curva obtida pela relação entre a força de descolamento (mN) versus a distância de desconexão (mm) (Nep et al., 2011).

Os resultados demonstraram o mesmo perfil de força de descolamento e trabalho de adesão para todas as formulações testadas (Fig. 25). Os nanossistemas espessados em hidrogéis mostraram-se mais bioadesivos, pois os trabalhos de adesão e força de descolamento foram, respectivamente, cerca de 8x e 3x maiores para HNE e HCLN em comparação com NE e CLN, mostrando diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Em termos de aspecto, NE e CLN são soluções líquidas esbranquiçadas com viscosidade muito baixa, enquanto HNE e HCLN consistem em estruturas poliméricas 3D com maior viscosidade e característica semi-sólida. A maior viscosidade dos hidrogéis é atribuída ao inchaço do polímero na fase contínua da nanoemulsão e do transportador lipídico nanoestruturado, o que levou a uma maior força de descolamento da pele suína (Alam et al., 2012; Sutradhar et al., 2013). Assim, a rede polimérica da hidroxietilcelulose nos nanossistemas espessados com hidrogéis está relacionada à maior bioadesividade do HNE e do HCLN em

comparação com o NE e o CLN, influenciando principalmente o tempo de permanência dos hidrogéis na pele de orelha suína.

A característica bioadesiva é uma propriedade interessante para os nanossistemas, pois o tempo de permanência pode ser prolongado, levando a uma redução na dose e na frequência de aplicação, e também pode impactar na melhor adesão do paciente (Carvalho et al., 2013).

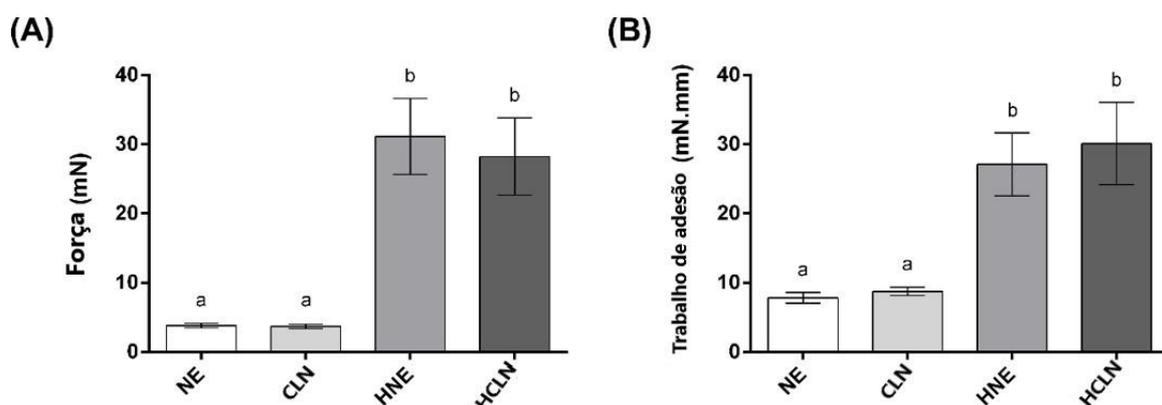


Fig. 25. Medições de bioadesão da força (A) e trabalho de adesão (B) para NE, CLN, HNE e HCLN. Os resultados são apresentados como média \pm DP ($n = 6$). Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), enquanto as mesmas letras não indicam diferença estatística ($p \geq 0,05$). NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HNE: nanoemulsão espessada com hidrogel de hidroxietilcelulose contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidroxietilcelulose com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

5.5.4 Liberação de dilapiol das formulações

Os perfis de liberação de dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* e nanossistemas foram avaliados em células de difusão do tipo Franz com membranas de éster de celulose, como mostrado na Fig. 26.

Durante 12 horas, alíquotas de RF foram coletadas e analisadas por HS-GC-FID. A quantidade total de dilapiol liberado e as formulações foram estimadas em porcentagem e os resultados foram $10,53 \pm 4,58$, $12,17 \pm 0,50$, $3,96 \pm 0,81$ e $8,13 \pm 0,47\%$ para OEPA, NE, CLN e HNE, respectivamente. A liberação de dilapiol foi mais rápida em comparação com as formulações, especialmente nas primeiras 6 h, atingindo um platô após 10 h (Fig. 26). A NE foi a substância testada que apresentou melhores resultados em termos de liberação de dilapiol. Foi relatado anteriormente que a nanoencapsulação pode favorecer a liberação de compostos ativos devido ao tamanho nanométrico e à alta área interfacial (Rai et al., 2018).

Além disso, o dilapiol de NE, CLN e HNE mostrou uma liberação controlada e constante, onde o nanocarreador parece fornecer um padrão de liberação bifásico caracterizado por uma explosão inicial (mais rápida nas primeiras 2 h), seguida por uma liberação comparativamente mais lenta e contínua (Fig. 26) A liberação de dilapiol do NE foi superior a CLN em torno de 3x, o que pode estar relacionado ao núcleo sólido do CLN, exigindo mais tempo para o dilapiol deixar o núcleo oleoso e se difundir através da membrana. Üner e co-autores relataram diferenças entre a nanoemulsão e o carreador lipídico nanoestruturado nas taxas de difusão do celecoxib, atribuindo esse efeito à mobilidade e maleabilidade das gotículas de nanoemulsão (Uner et al., 2014). Além disso, uma baixa liberação foi observada para HNE em comparação com NE, quase 1,5x, principalmente associada ao aumento da viscosidade do hidrogel (Contri et al., 2010).

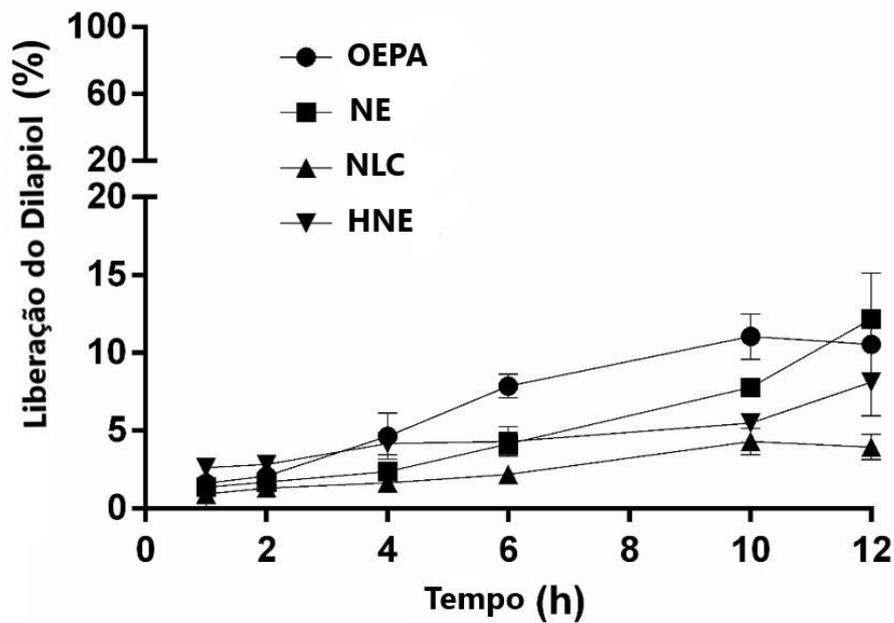


Fig. 26. Perfil de liberação do dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* (EOPA), nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum* (NE), carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum* (CLN) e nanoemulsão espessada com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum* (HNE)) (n = 3).

5.5.5 Estudos de permeação / retenção *in vitro*

Os estudos de permeação / retenção *in vitro* para dilapiol, NE, CLN, HNE e HCLN foram realizados com aparelho celular de difusão Franz. A Figura 27 mostra os resultados da permeação de dilapiol na epiderme, derme e fluido receptor após o ensaio com pele de porco.

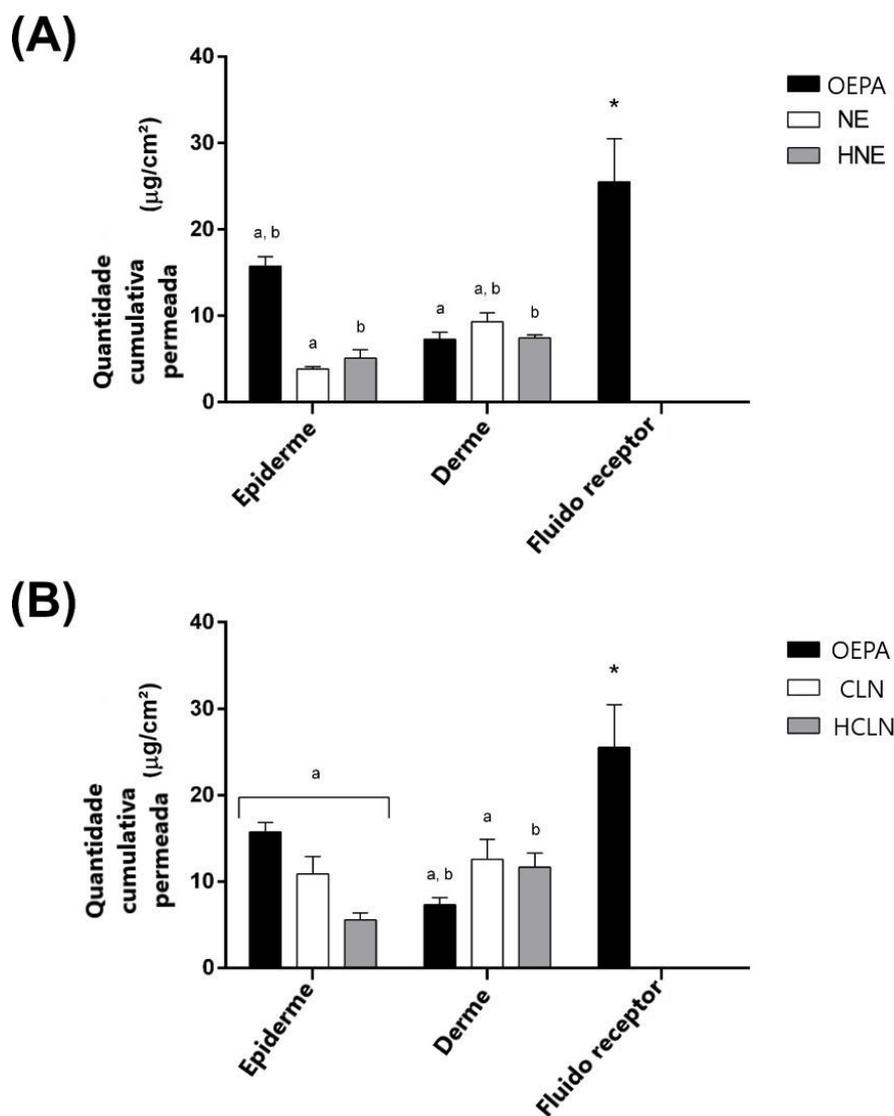


Fig. 27 Quantidade cumulativa permeada de dilapiol, nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum* (NE), carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum* (CLN), nanoemulsão espessada por hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum* (HNE) e carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum* (HCLN). Após 8 h, o estrato córneo não foi encontrado em todas as substâncias testadas. Os resultados são apresentados como média \pm DP (n = 5).

As mesmas letras significam diferença estatisticamente significativa pela ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos (*) representam

diferença estatisticamente significativa de NE, HNE, NLC e HNLC pela ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Após 8 h, o dilapiol, não foi encontrado no estrato córneo para todas as substâncias testadas. A quantidade cumulativa permeada de dilapiol estava na ordem do líquido receptor >> epiderme >> derme. Este resultado evidencia a alta capacidade do dilapiol para penetrar nos tecidos profundos. Os óleos essenciais e seus compostos ativos são capazes de superar a barreira cutânea afetando o empacotamento intercelular dos lipídios do estrato córneo, o que poderia ser uma explicação para a permeação de dilapiol (Asbill et al., 2000).

Além disso, para NE, CLN, HNE e HCLN, a quantidade cumulativa permeada de dilapiol estava na ordem derme >> epiderme (Fig. 27). Como pode ser observado, para todas as formulações que contêm nanocarreadores, mesmo os espessados com hidroxietilcelulose, a camada que mais reteve o dilapiol foi a derme, atribuindo esse efeito à capacidade dos nanocarreadores de solubilizar substâncias hidrofílicas e lipofílicas, tamanho pequeno e grande área superficial, promovendo a penetração em camadas mais profundas (Roberts et al., 2017). Isso é desejável, uma vez que existem vários tipos de células responsáveis pelos processos de inflamação e cicatrização na derme (Benson et al., 2011). Além disso, foi observada uma menor retenção de dilapiol na derme de HNE e HCLN, em comparação com NE e CLN (Fig. 27). Os nanocarreadores espessados com hidrogéis podem interferir na liberação de compostos ativos devido à alta viscosidade, fazendo com que os ativos deixem a rede polimérica e depois penetrem na pele (Contri et al., 2010).

Somente para OEPA pura, o dilapiol foi encontrado no fluido receptor (Fig. 27). A absorção de dilapiol do óleo essencial puro pode afetar a toxicidade e provocar efeitos sistêmicos indesejados. Como observado, para NE, CLN, HNE e HCLN, o dilapiol não foi percebido no fluido receptor, mostrando a capacidade dos nanocarreadores em diminuir a absorção sistêmica. As nanoformulações oferecem vantagens notáveis relacionadas à

aplicação mais fácil, absorção sistêmica reduzida e seletividade aprimorada à pele afetada em comparação aos tratamentos tradicionais (Vogt et al., 2016).

Os resultados acima são muito promissores quando a intenção é aplicar formulações contendo nanocarreadores para o tratamento de processos inflamatórios tópicos.

5.5.6 Perfil de segurança da HET-CAM

O teste da membrana corioalantóica da galinha (HET-CAM) é um modelo alternativo simples, barato e in vitro ao uso de animais capazes de avaliar o potencial irritante de substâncias e formulações, incluindo hidrogéis, fornecendo resultados preliminares de triagem de eventos vasculares e avaliação de segurança antes estudo in vivo (Luepke, 1985; Luepke et al., 1986; Vargas et al., 2007; Pereira et al., 2016; Batista-Duarte et al., 2016).

A Figura 28 e a Tabela 12 apresentam os resultados de irritação na CAM (n = 5). O lauril sulfato de sódio a 1% p / ve o hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M foram aplicados como controle positivo para vasoconstrição e hemorragia e coagulação, respectivamente. Os escores de irritação para lauril sulfato de sódio e NaOH foram, respectivamente, 11,14 e 13,51, sendo ambos extremamente irritantes. Além disso, como solução de controle negativo (não irritante) de cloreto de sódio (NaCl 0,9% p / v) foi utilizada, cuja pontuação de irritação foi 0, como esperado, não sendo irritante para a CAM. Para solubilizar o óleo essencial de *P. aduncum* na mesma proporção dos nanossistemas, o óleo de oliva foi aplicado, uma vez que é considerado um controle não irritante e apresentou escore de irritação 0, como esperado (Villone et al., 2008). As formulações em branco sem o óleo essencial (B-NE, B-CLN, HB-NE e HB-CLN) apresentaram escore de irritação de 0, sendo consideradas não irritantes, confirmando que os surfactantes e polímeros não influenciaram a toxicidade nas formulações . Enquanto isso, a OEPA solubilizada em azeite na proporção de 1:20 mostrou um ligeiro escore de irritação de 4,38. Além disso, CLN contendo dilapiol e seu hidrogel derivado (HCLN) apresentaram um ligeiro escore de irritação de 4,68 e 4,82,

respectivamente, enquanto o mesmo padrão foi observado para o NE e hidrogel derivado (HNE), 4,68 e 4,82, respectivamente. Esses resultados sugerem que as formulações contendo OEPA apresentaram baixo índice de irritação, o que pode estar relacionado aos seus compostos, incluindo o dilapiol. Em estudos anteriores, o óleo essencial de *P. aduncum* pode ser considerado genotoxicamente seguro (Guerrini et al., 2009). Por outro lado, a toxicidade do óleo essencial de *P. aduncum* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi descrita (Silva et al., 2009). Também foi relatado que o OEPA é capaz de aumentar a curva de fragilidade osmótica dos glóbulos vermelhos (Barros et al., 2016). Esses achados indicam que o óleo essencial tem de fato uma correlação com o potencial irritante encontrado no ensaio HET-CAM, no entanto, a literatura não apresenta uma explicação clara sobre a provável causa de irritação da OEPA. É importante destacar que a toxicidade e irritabilidade das substâncias dependem de vários fatores, inclusive composição e concentração (Barros et al., 2016). Nesse sentido, como sugestão para substâncias pouco irritantes, Oliveira e co-autores recomendaram um ponto de corte de 4,9, indicando baixo potencial irritante para formulações abaixo desse valor (Oliveira et al., 2012). Assim, como as pontuações IS para todas as formulações contendo óleo essencial de *P. aduncum* (NE, CLN, HNE e HCLN) foram inferiores a 4,9, os nanossistemas desenvolvidos e os hidrogéis derivados foram considerados seguros para aplicação tópica.

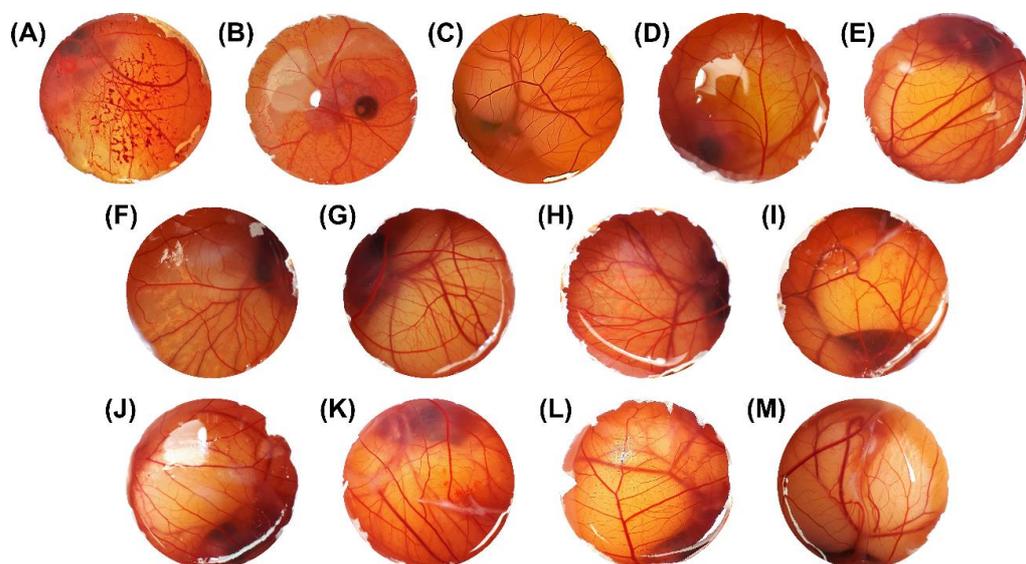


Fig. 28. Sequência de fotografias que ilustram os efeitos de diferentes substâncias aplicadas na membrana corioalantóica durante um período de 5 minutos. (A) NaOH 0,1 M; (B) laurilsulfato de sódio a 1% p / v; (C) NaCl 0,9% p / v; (D) azeite; (E) Óleo essencial de *P. aduncum*: Azeite (1:20 v / v); (F) nanoemulsão em branco; (G) Nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; (H) carreador lipídico nanoestruturado em branco; (I) carreador lipídico nanoestruturado contendo óleo essencial de *P. aduncum*; (J) nanoemulsão em branco espessada em hidrogel; (K) nanoemulsão espessada em hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*; (L) carreador lipídico nanoestruturado espessado em hidrogel; (M) carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*.

Table 12. Classificação dos escores cumulativos no teste da membrana corioalantóica (HET-CAM) (n = 5).

	IS (RSD)	Resultados
NaCl 0.9% m/v	0 (0)	Não irritante
Lauril sulfato de sódio 1% m/v	11.14 (0.62)	Extremamente irritante
NaOH 0.1 M	13.51 (1.15)	Extremamente irritante
Óleo de oliva	0 (0)	Não irritante
EOPA : Óleo de oliva (1:20)	4.38 (3.61)	Levemente irritante
B-NE	0 (0)	Não irritante
NE	4.08 (9.88)	Levemente irritante
HB-NE	0 (0)	Não irritante
HNE	4.81 (0.38)	Levemente irritante
B-CLN	0 (0)	Não irritante
CLN	4.68 (6.77)	Levemente irritante

HB-CLN	0 (0)	Não irritante
HCLN	4.82 (0.29)	Levemente irritante

IS: escore de irritação; RSD: desvio padrão relativo em porcentagem; B-NE: nanoemulsão em branco; B-CLN: carreador lipídico nanoestruturado em branco; NE: nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. aduncum*; CLN: carreador lipídico nanoestruturado contendo *P. aduncum*; HB: hidrogel de hidroxietilcelulose; HB-NE: nanoemulsão em branco espessada em hidrogel; HB-CLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado em hidrogel; HNE: nanoemulsão espessada em hidrogel contendo óleo essencial de *P. aduncum*; HCLN: carreador lipídico nanoestruturado espessado com hidrogel contendo *P. aduncum*.

6. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Piper aduncum* extraído por arraste a vapor em extrator elétrico apresentou elevados rendimentos de óleos essenciais e o alto teor de dilapiol;
- As análises cromatográficas do óleo essencial de *P. aduncum* identificou o teor de 80.05% de dilapiol;
- Pela primeira vez foram realizadas microemulsões com dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum* para os estudos que provaram que esta formulação é uma via alternativa na busca de substâncias que melhoram a ação dos antimicrobianos, de modo que, quando testados com bactérias Gram-positivas, foram observados sinergismo e antagonismo em combinação com os medicamentos. A microemulsão com dilapiol se apresenta como um agente modulador da atividade antimicrobiana, sendo um produto natural que pode representar uma alternativa interessante nos esforços para combater doenças infecciosas e patógenos causados por bactérias resistentes aos antibióticos atuais.

- Este é o primeiro estudo de complexos de inclusão de dilapiol com ciclodextrinas. Os resultados de FTIR, SEM, DRX, TG revelaram que o Dilapiol foi capaz de formar com sucesso os complexos de inclusão. Consequentemente, o FTIR mostrou deslocamentos nos números de onda e uma variação no pico de intensidade característica da ciclodextrina e dilapiol. As caracterizações morfológicas e cristalinas mostraram variações na forma, aparência, e perfil amorfo dos complexos em comparação com ciclodextrinas isoladamente. Quanto à análise térmica, as variações de temperatura nas perdas de massa e variações de entalpia entre o dilapiol confirmam a formação de complexos de inclusão. Os complexos de inclusão com conteúdo de dilapiol se apresentou como um potente antibacteriano e agente modulador da atividade antibacteriana.
- Pela primeira vez foram avaliados o potencial do dilapiol em formulações farmacêuticas como os carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões para a permeação tópica e liberação das substâncias nas formulações em nano. O dilapiol nas formulações foi identificado/retido nas camadas mais profundas da pele, sem acessar o fluido receptor que mostra que a substância não acessa a corrente sanguínea evitando assim níveis tóxicos no organismo. Já o dilapiol puro foi identificado até no fluido receptor. Isso mostra que as nanoformulações capacitaram a retenção do dilapiol nas camadas mais profundas da pele. Este estudo mostra a capacidade das nanos para a produção de medicamentos por via tópica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, R.L.; Rodriguez, F.J.; Guarda, A.; Galotto, M.J.; Bruna, J.E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* 196, 968–975. 2016.

Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4.1 ed, Allured, Northbrook, 2017.

Alam, M.S.; Ali, M.S.; Alam, N.; Alam, M.I.; Anwer, T.; Imam, F.; Ali, M.D.; Siddiqui, M.R.; Shamim, M. Design and characterization of nanostructure topical gel of betamethasone dipropionate for psoriasis, *J. Appl. Pharm. Sci.* 2:148–158. 2012.

Alencar, R.D.; Lima, R.; Corrêa, R.C.; Gottlieb, O.R.; Marx, M.C.; Silva, M.; Assumpção, R.V. Óleos essenciais de plantas brasileiras. *Acta Amazonica*, 1: 41-43. 1971.

Alice, L.; Barcelos, O. B.; Ruppenthal, E. J.; Beck, R. C. Innovation in pharmaceutical nanotechnology in brazil: An analysis of patent deposits and academic production. *Espacios.* 34:6, 2013.

Almeida, R.R.; Souto, R.N.; Bastos, C.N.; Silva, M.H.; Maia, J.G. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole Rich Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity*, 6: 1427-1434. 2009.

Almeida, M.E.; Teixeira, H.F.; Koester, L.S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade, *Lat. Am. J. Pharm.* 27 :780–788. 2008.

Asbill, C.S.; Michniak, B.B. Percutaneous penetration enhancers: Local versus transdermal activity, *Pharm. Sci. Technol. Today.* 3:36–41. 2000.

Andrade, E.H.A.; Alves, C.N.; Guimarães, E.F.; Carreira, L.M.M.; Maia, J.G.S. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 669-675. 2011.

E. Andrade, L. Faria, Otimização experimental da destilação de óleo essencial de Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) por arraste com vapor, in: XVIII Congr. Bras. Eng. Química, Foz do Iguaçu, 2010: pp. 1–8. https://www.researchgate.net/publication/274071444_OTIMIZACAO_EXPERIMENTAL_DA_DESTILACAO_DE_OLEO_ESSENCIAL_DE_PIMENTA-DE-MACACO_Piper_aduncum_L_POR_ARRASTE_COM_VAPOR.

Arrigoni-Blank, M.F.; Dmitrieva, E.G.; Franzotti, E.M.; Antonioli, A.R.; Andrade, M.R.; Marchioro, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 215-218. 2004.

Arze, J.B.L.; Collin, G.; Garneau, F.X.; Jean, F.I.; Gagnon, H. Essential Oils from Bolivia. VIII. Piperaceae: *Piper heterophyllum* Ruiz et Pavón, *P. aduncum* L, *J. Essent. Oil-Bearing*

Plants. 11:53–57. 2008.

Araujo, D.R.; Tsuneda, S.S.; Cereda, C.M.S.; Carvalho, F.D.G.F.; Preté, P.S.C.; Fernandes, S.A.; Yokaichiya, F.; Franco, M.K.K.D.; Mazzaro, I.; Fraceto, L.F.; et al. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33:60–71. 2008.

Autran, E.S.; Neves, I.A.; Silva, C.S.B.; Santos, G.K.N.; Câmara, C.A.G.; Navarro, D.M.A.F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*, 100: 2284-2288. 2009.

Aulton, M.E.; Taylor, K.M.G. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, 2. ed., Churchill Livingstone, London, 2001.

Awad, R.; Ahmed, F.; Bourbonnais-Spear, N.; Mullally, M.; Ta, C.A.; Tang, A.; Poveda, L.. Ethnopharmacology of Q'eqchi'Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. *Journal of Ethnopharmacology*, 125: 257-264. 2009.

Aytac, Z.; Yildiz, I. Z.; Kayaci-Senirmak, F.; Tekinay, T.; Uyar, T. Electrospinning of cyclodextrin/linalool-inclusion complex nanofibers: Fast-dissolving nanofibrous web with prolonged release and antibacterial activity. *Food Chemistry*, 231: 192-201. 2017.

Barbosa, Q.P.; Câmara, C.A.; Ramos, C.S.; Nascimento, D.C.; Lima-Filho, J.V.; Guimarães, E.F. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Química Nova*, 35: 1806-1808. 2012.

Batista-Duharte, A.; Jorge Murillo, G.; Pérez, U.M.; Tur, E.N.; Portuondo, D.F.; Martínez B.T.; Téllez-Martínez, D.; Betancourt, J.E.; Pérez, O. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants, *Int. J. Toxicol.* 35:627–633. 2016.

Barreiro, E.J.; Fraga, C.A. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e antitrombóticos. *Química Nova*, 22: 744-759. 1999.

Barradas, T.N.; Senna, J.P.; Cardoso, S.A.; Nicoli, S.; Padula, C.; Santi, P.; Rossi, F.; de Holanda e Silva, K.G.; Mansur, C.R.E. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 116:38–50. 2017.

Basak, S.; Guha, P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 75: 616–623. 2017.

Barros, F.J.; Costa, R.J.O.; Cesário, F.R.A.S.; Rodrigues, L.B.; da Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M.; Galvao, H.B.F.; de Menezes, I.R.A. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes, *Eur. J. Integr. Med.* 8:505–512. 2016.

Bastos, C.N.; Albuquerque, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. *Fitopatologia brasileira*, 29: 555-557. 2004.

Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 2010.

Bhandari, R.; Kaur, I.P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 441, n.1-2, p.202-12, 2013.

Benson, H.A.E.; Watkinson, A.C. *Topical and Transdermal Drug Delivery*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011.

Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1–14, 2014.

Bin Jantan, I.; Ahmad, A.R.; Ahmad, A.S.; Ali, N.A.M. A comparative study of the essential oils of five piper species from Peninsular Malaysia, *Flavour Fragr. J.* 9:339–342. 1994.

Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32:588-594, 2009.

Bose, S.; Du, Y.; Takhistov, P.; Michniak-Kohn, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International Journal of Pharmaceutics*, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

Bourbonnais-Spear, N.; Awad, R.; Maquin, P.; Cal, V.; Sanchez-Vindas, P.; Poveda, L.; Arnason, JT. Plant use by the Q'Eqchi' Maya of Belize in ethnopsychiatry and neurological pathology. *Economic Botany*, 59: 326–336. 2005.

Branquinho, S.L.; Santosa, A.J.; Cardoso, L.A.C.; Mota, S.J.; Lanza-Junior, U.; Kassuya, L.A.C.; Arena, C.A. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 198: 372–378. 2017.

Brazão, M.A.B.; Brazão, F.V.; Maia, J. G. S.; Monteiro, M.C. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13: 517-526, 2014.

Borghetti, G.S.; Knorst, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares, *Rev. Bras. Ciências Farm.* 42:531–537.2007.

Bruxel, F.; laux, M.; Wild, L.B.; Fraga, M.; Koester, L.S.; Teixeira, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

Bulani, V.D.; Kotavade, P.S.; Kundaikar, H.S.; Gawali, N.B.. Inclusion complex of ellagic acid with β -cyclodextrin: Characterization and in vitro anti-inflammatory evaluation. *J. Mol. Struct.* 1105, 308–315. 2016.

Burger, W.C. *Piperaceae*. In: *Burger, WC*, editor. *Fieldiana Botany: Flora Costaricensis*. Chicago: Field Museum of Natural History; p. 5-218. 1971.

Buwalda, S.J.; Boere, K.W.M.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W.E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *J. Control. Release*. 190:254–273. 2014.

Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Pino-Benítez, N.; Stashenko, E.E. Chemical composition and bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13: 10-19. 2014.

Carvalho, F.C.; Calixto, G.; Hatakeyama, I.N.; Luz, G.M.; Gremião, M.P.D.; Chorilli, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39:1750–1757. 2013.

Carneiro, S., Costa Duarte, F., Heimfarth, L., Siqueira Quintans, J., Quintans-Júnior, L., Veiga Júnior, V., & Neves de Lima, Á. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: *In Vivo* and *In Vitro* Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 642, 2019.

Céline, V.; Adriana, P.; Eric, D.; Joaquina, A.C.; Yannick, E.; Augusto, L.F.; Rosario, R.; Dionicia, G.; Michel, S., Denis, C. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 413-422. 2009.

Cheirsilp, B.; Rakmai, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine*, 2: 1-6. 2017.

Chetoni, P.; Burgalassi, S.; Monti, D.; Tampucci, S.; Tullio, V.; Cuffini, A.M.; Muntoni, E.; Spagnolo, R.; Zara, G.P.; Cavalli, R. Solid lipid nanoparticles as promising tool for intraocular tobramycin delivery: Pharmacokinetic studies on rabbits, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 109:214–223. 2016.

Corral, T. C. A. Uso do óleo essencial de *Piper aduncum* na ração para o controle de nematóides de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ, 1822). 67f. Dissertação de mestrado (Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Nilton Lins. Manaus, Amazonas, 2014.

Cremasco, M.A.; Braga, N.P. Tecnologia de Processamento do óleo essencial de pimentalonga (*Piper hispidinervum* C. DC.) para a produção de piperonal. In: Associação Brasileira de Engenharia Química, editors. *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Foz do Iguaçu: *Associação Brasileira de Engenharia Química*, 1-11.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Reissue. New York: Columbia University Press. 2010.

Contri, R. V.; Kutzer, T.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery, *Soft Mater.* 8:370–385. 2010.

Cysne, J.B.; Canuto, K.M.; Pessoa, O.D.L.; Nunes, E.P.; Silveira, E.R. Leaf essential oils

of four Piper species from the state of Ceará - northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16: 1378-1381. 2005.

Damasceno, B. P. G. L. et al. Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.

Damasceno, B.P.G.L.; Silva, J.A.; Oliveira, E.E.; Silveira, W.L.L.; Araújo, I.B.; Oliveira, A.G.; Egito, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para 63 moléculas insolúveis. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32: 9-18. 2011.

Di Sotto, A.; Mazzant, G.; Carbone, I.F.; Hrelia, P.; Maffei F. Inhibition by trans-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research Genetics Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 699: 23-28. 2010.

Elisabetsky, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, 32: 235-239. 1991.

El Asbahani, A.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E.H.A.; Casabianca, H.; El Mousadik, A.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.R.; Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation, *Int. J. Pharm.* 483:220–243. 2015.

European medicines agency, Guideline on bioanalytical method validation, EMEA, Comm. Med. Prod. Hum. Use. 44 1–23. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. 2012.

Evans, P.H.; Bowers, W.S.; Funk, E.J. Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1254-1256. 1984.

Facundo, V.A.; Polli, A.R.; Rodrigues, R.V.; Militão, J.S.L.T.; Stabelli, R.G.; Cardoso, C.T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazonica*, 38: 733-742. 2008.

Fanun, M. Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17: 306–313. 2012.

Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Catani, V.; Alécio, M.R.; Lima, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. D.C.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. *Ciência e Agrotecnologia de Lavras*, 31: 113-120. 2007.

Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and β -caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, *European Journal of Pharmacology*, 569: 228-236. 2007.

Ferreira, R.; Monteiro, M.; Silva, J.; Maia, J. Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of *Piper aduncum* against Dermatofungaloses Caused by Filamentous Fungi, *Br. J. Med. Res.* 15:1–10. 2016.

Formariz, T. P.; Urban, M.C.C.; Silva Júnior, A. A.; Gremião, M.P.D.; Oliveira, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41: 301-313. 2005.

Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical method validation, U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. 1–34. <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-ioanalytical-4252fnl.pdf>. 2013.

Frodin, D.G. History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53: 753-776. 2004.

Gartner, B.L. Breakage and regrowth of *Piper* species in rain forest understory. *Biotropica*, 21: 303-307. 1989.

Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

Ghosh, V.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics sonochemistry*, v.20, n.1, p.338-44, 2013.

Gogosz, A.M.; Boeger, M.R.T.; Negrelle, R.R.B.; Bergo, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). *Rodriguesia*, 63: 405-417. 2012.

Gottlieb, O.R.; Koketsu, M.; Magalhães, M.T.; Maia, J.G.S.; Mendes, P.H.; da Rocha, A.I.; da Silva, M.L.; Wilberg, V.C. Óleos essenciais da Amazônia VII., *Acta Amaz.* 11: 143–148. 1981.

Grimshaw, J.; Hua, C. The conversion of isosafrole to piperonal and anethole to anisadehyde: electrochemical active manganese dioxide. *Electrochimica Acta*, 39: 497-499. Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Rossi, D.; Paganetto, G.; Muzzoli, M.; Andreotti, E.; Tognolini, M.; Maldonado, M.E.; Bruni, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27:39–48. 2009.

Guimarães, E.F.; Giordano, L.C.S. 2004. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguesia*, 55: 21-46. 1994.

Gunasekaran, T.; Haile, T.; Nigusse, T.; Dhanaraju, M.D. Nanotechnology: An effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4:S1–S7. 2014.

Guimarães, E.F.; Valente, M.C. *Piperaceae – Piper*. In: Reis, A, editor. Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. p. 4- 91.2001.

Gupta, M.P.; Arias, T.D.; Williams, N.H.; Bos, R.; Tatije, D.H.E. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper aurztum* of Panama. *Journal of Natural Product*, 48: 330-343. 1985.

Gurib-fakim, Ameenah. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mauritius, Molecular Aspects of Medicine, v. 27, p. 1-93, 2006.

H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Phytomedicine* 16:97–110, 2009.

Coutinho, H. D. M.; J.G.M. Costa, J.P. Siqueira-Júnior, E.O. Lima, In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:670– 675, 2008.

Harrar, A. et al. Influence of surfactant amphiphilicity on the phase behavior of IL-based microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 362, n. 2, p. 423-9, 2011.

Hu, L. et al. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 420, n. 2, p. 251–255, 2011.

Jabir, S.M.; Taha, A.A.; Taqi, J.Z.; Al-Shammari, M.A.; Salman, S.A. Novel of nano delivery system for Linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line. *Materials Science & Engineering*, 94: 949–964. 2019.

Jaramillo, C.J.; Julio, T.E.; Duarte, R.A.; Gonzalez, C.L.F.; Torres, J. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. *Boletim Latinoamericano*, 14: 343–354. 2015.

Jimenez, M.; Jazmín A; Domínguez, A.; Luz, A.; Pascual-Pineda, B.; Ebner Azuara, A.; Beristain, A. Elaboration and characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2017: 1-9. 2017.

Jaiswal, M.; Dudhe, R.; Sharma, P.K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system, 3 *Biotech*. 5:123–127. 2015.

Jenning, V.; Thünemann, A.F.; Gohla, S.H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.* 199:167–177. 2000.

Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Nagassoum, M.B.; Geissler, M.. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid phase microextraction gas chromatography, solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A*, 976: 265–275. 2002.

Klang, V.; Schwarz, J.C.; Lenobel, B.; Nadj, M.; Auböck, J. ; Wolzt, M.; Valenta, C. In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80:604–614. 2012.

Klauke, A.L.; Racza, I.; Pradiera, B.; Markerta, A.; Zimmera, M.A.; Gertschb, J.; Zimmer, A. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*. 24: 608-620. 2014.

Kreutz, T.; Lucca, L.G.L.G.; Loureiro-Paes, O.A.R.O.A.R.; Teixeira, H.F.H.F.; Veiga,

V.F.V.F.; Limberger, R.P.R.P; Ortega, G.G.G.; Koester, L.S.L.S. Optimization, validation and application of headspace solid-phase microextraction gas chromatography for the determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil in skin permeation samples, *J. Chromatogr. A.* 1564:163–175. 2018.

Koo, O. M.; Rubinstein, I.; Onyuksel, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 1, n. 3, p. 193-212, 2005.

Koch, C.; Reichling, J.; Kehm, R.; Sharaf, M.M.; Zentgraf, H.; Schneele, J.; Schnitzler, P. Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses, *J. Pharm. Pharmacol.* 60:1545–1550. 2008.

ICH, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Int. Conf. Harmon. (2005) 17.
doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. 1994.

Lee, S.E.; Park, B.S.; Kim, M.K.; Choi, W.S.; Kim, H.T.; Cho, K.Y.; Lee, S.G.; Lee, H.S. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 20: 523–528. 2001.

Li, Q. et al. Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 490, n. 1–2, p. 22–31, 2015.

Lima, D.K.; Ballico, L.J.; Rocha, L.F.; Gonçalves, H.P.; Souza, L.M.; Iacomini, M.; Werner, M.F.; Baggio, C.H.; Pereira, I.T.; Silva, L.M.; Facundo, V.A.; Santos, A.R. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 142: 274–282. 2012.

Lima, P. S. S., Lucchese, A. M., Araújo-Filho, H. G., Menezes, P. P., Araújo, A. A. S., Quintans-Júnior, L. J., & Quintans, J. S. S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*. 151:965–987, 2016.

Lin, Y. et al. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 30, n. 7, p. 1301–1307, 2007.

Linton, J. D.; Walsh, S. T. “Acceleration and extension of opportunity recognition for nanotechnologies and other emerging technologies”. *International Small Business Journal*. 26: 83-99, 2008.

Li, Q.; Cai, T.; Huang, Y.; Xia, X.; Cole, S.P.C.; Cai, Y. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs, *Nanomaterials*. 7:1–25. 2017.

Liu, H.; Yang, G.; Tang, Y.; Cao, D.; Qi, T.; Qi, Y. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of b-caryophyllene/b-cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 304-310. 2013.

Lobato, A.K.; Santos, D.G.C.; Oliveira, F.C.; Gouvea, D.D.S.; G.I.O. da S. Torres, J. Alves, J.A. de L. Júnior, C.F. de O. Neto, M.H.L. da Silva, Ação do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L. Utilizado como Fungicida Natural no Tratamento de Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., Rev. Bras. Biociências. 5:915–917. 2007.

Lucca, G. L.; Matos, P. S.; Kreutz, T.; Teixeira, F. H.; Limberger, P. R.; Veiga-Júnior, F. V.; Araújo, V. B.; Koester, S. L. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *AAPS PharmSciTech*, 19: 522-530. 2017.

Luepke, N.P.; Kemper, F.H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test, *Food Chem. Toxicol.* 24:495–496. 1986.

Lucca, G. L.; Matos, P. S.; Mattos, B. C.; Teixeira, F. H.; Limberger, P. R.; Veiga-Júnior, F. V.; Araújo, V. B.; Koester, S. L. Nanoemulsification Potentiates In Vivo Antiedematogenic Effect of Copaiba Oil. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13:583–590. 2017.

Luepke, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food Chem. Toxicol.* 23:287–291. 1985

Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Luiz, A.I.R.; Zoghbi, M.G.B.; Ramos, L.S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. *Química nova*, 10: 200-204. 1987.

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A. 2001. Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 173p. 2001.

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Bastos, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour And Fragrance Journal*, 13: 269-272. 1998.

Maia, JGS; Zoghbi, MGB; Andrade, EHA, et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour And Fragrance Journal*, v. 13, p. 269-272, 1998.

Marques, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 25: 313-326, 2010.

Matos, S. P., Lucca, L. G., & Koester, L. S. Essential oils in nanostructured systems: challenges in preparation and analytical methods. *Talanta*. 195:204-214, 2019.

Matos, S.P.; Teixeira, H.F.; Lima, Á.A.N.; Veiga-Junior, V.F.; Koester, L.S. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration: A Review., *Biomolecules*. 9:138. 2019.

Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *J. Pharm. Biomed.* 113, 226–238. 2015.

Magalhães, T.S.S.; de Oliveira Macedo, P.C.; Kawashima Pacheco, S.Y.; Silva, S.S.; Barbosa, E.G.; Pereira, R.R.; Costa, R.M.R.; Silva Junior, J.O.C.; da Silva Ferreira, M.A.;

de Almeida, J.C.; Rolim Neto, P.J.; Converti, A.; Neves de Lima, Á.A. Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of Euterpe oleracea Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 942. 2020.

Mehta, D.P.; Rathod, H.J.; Shah, D.P. "Microemulsions: A Potential Novel Drug Delivery System. Department of Pharmaceutics". *International Journal of Pharmaceutical Science*, 1: 48-60. 2015.

Meireles, N.S. Influência dos metabolitos secundários de *Piper divaricatum* da região amazônica no controle do *Fusarium solani* f. sp. piperis causador da fusariose em pimenta do reino. Federal University of Pará (Masters dissertation). Belém, Pará, Brazil. 183 p. 2014.

Melo, P.N.; Barbosa, E.G.; Garnero, C.; Caland, L.B.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; Longhi, M.R.; Silva-Júnior, A.A. Interaction pathways of specific co-solvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benzimidazole in liquid and solid phase. *J. Mol. Liq.* 223:350–359. 2016.

Medarević, D.; Kachrimanis, K.; Djurić, Z.; Ibrić, S. Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 78:273–285. 2015.

McClements, D.J.; Jafari, S.M. *General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation*, Elsevier Inc., 2018.

Mesquita, J.M.O.; Cavaleiro, C.; Cunha, A.P.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15: 6-12. 2005.

Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Carvalho, Y.M.B.G.; Santana, D.V.S.; Lima, B.S.; Quintans-Júnior, L.J.; Marreto, R.N.; Aquino, T.M.; Sabino, A.R.; Scotti, L.; et al. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of β -cyclodextrin containing carvacrol. *J. Mol. Struct.* 1125:323–330. 2016.

Montanari, C.A.; Bolzani, V. da S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. São Paulo, Química Nova, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

Monzote, L.; García, M.; Montalvo, A.M.; Scull, R.; Miranda, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105: 168-173. 2010.

Montenegro, L.; Lai, F.; Offerta, A.; Sarpietro, M.G.; Micicché, L.; Maccioni, A.M.; Valenti, D.; Fadda, A.M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32: 100–112. 2016.

Monzote, L.; Scull, R.; Cos, P.; Setzer, W. Essential Oil from *Piper aduncum*: Chemical Analysis, Antimicrobial Assessment, and Literature Review, *Medicines*. 4:49. 017.

Moraes, S.M.; Facundo, V.A.; Bertini, L.M.; Cavalcanti, E.S.B.; Júnior, J.F.A.; Ferreira, A.S.; Brito, E.S.; Neto, M.A.S. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 670-675.

Monteiro, C.; Franco, J.M.; Proença, P.; Castañera, A.; Claro, A.; Vieira, D.N.; Corte-Real, F. Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: application in practical cases, *Forensic Sci. Int.* 243 :137–143. 2014.

Mundina, M.; Vila, R.; Tomi, F.; Gupta, M.P.; Adzet, T.; Casanova, J.; Canigual, S. 1998. Leaf essential oils of three panamanian piper species. *Phytochemistry*, 47: 1277-1282.

Muller, R. H.; Shegokar, R. H.; Keck, C. M. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications, *Curr. Drug Discov. Technol.* 8:07–227. 2011.

Naoui, W. et al. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 7, p. 1683–1695, 2011.

Nascimento, A.S.; Araújo, A.E.; Silva, M.J.; Ramos, S.C. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60: 2837-2839. 2015.

Navickiene, H.M.D.; Morandim, A.A.; Alécio, A.C.; Regasini, L.O.; Bergamo, D.C.B.; Telascra, M.; Cavalheiro, A.J.; Lopes, M.N.; Bolzani, V.S.; Furlan, M.; Marques, M.O.M.; Young, M.C.M.; Kato, M.J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*, 29: 467-470. 2006.

Nasseri, M.; Golmohammadzadeh, S.; Arouiee; M.R. H. ; Jaafari, H. Neamati, Antifungal activity of zataria multiflora essential oil-loaded solid lipid nanoparticles in-vitro condition, *Iran. J. Basic Med. Sci.* 19:1231–1237. 2016.

Nep, E.I.; Conway, B.R. *Grewia gum 2*: Mucoadhesive properties of compacts and gels, *Trop. J. Pharm. Res.* 10:393–401. 2011.

Negreiros, J.R.S.; Miqueloni, D.P.; Cartaxo, C.B.C. Yield of essential oil and safrole content based on fresh and dry biomass of long Pepper in the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*, 45: 75-80. 2015.

Obeidat, W.M.; Schwabe, K.; Müller, R.H.; Keck, C.M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76:56–67. 2010.

Oliveira, G.L.; Cardoso, S.K.; Lara-Júnior, C.R.; Vieira, T.M.; Guimarães, E.F.; Figueiredo, L.S.; Martins, E.R.; Moreira, D.L.; Kaplan, A.M. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 4:1227-1234, 2013.

Oliveira, A.G.; Silva, R.S.; Alves, E.N.; Presgrave, R. de F.; Presgrave, O.A.F.; Delgado, I.F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 71:153–159. 2013.

Oliveira, S.M.; Cruze, N.J.; Silva, G.S.; Costa, A.W.; Sousa, B.H.S.; Bezerra, F.W.F.; Teixeira, E.; Silva, N.J.N.; Andrade, A.H.E.; Chaves-Neto, J.M.A.; Carvalho-Junior, N.R.. Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 145: 74–84. 2019.

Pardeike, J.; Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*. 21:170-84, 2009.

Passos, J.J.; Sousa, F.B.; Mundim, I.M.; Bonfim, R.R.; Melo, R.; Viana, A.F.; Stolz, E.D.; Borsoi, M.; Rates, S.M.K.; Sinisterra, R.D. In vivo evaluation of the highly soluble oral β -cyclodextrin—Sertraline supramolecular complexes. *Int. J. Pharm*. 436:478–485.

Parise-Filho, R.; Pastrello, M.; Camerlingo, C.E.P.; Silva, G.J.; Agostinho, L.A.; Souza, T.; Magri, F.M.M.; Ribeiro, R.R.; Brandt, C.A.; Polli, M.C. The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. *Pharmaceutical Biology*. 49: 1173–1179, 2011.

Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.D.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olsen, C.E.; Boll, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597–673. 1997.

Parra, J.E.; Delgado, W.A.; Cuca, L.E. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 4: 280-282. 2011.

Perazzo, F.; Souza, G.; Lopes, W.; Cardoso, L.; Carvalho, J.; Nanayakkara, N.; Bastos, J. Anti-inflammatory and analgesic properties of water– ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 215-220. 2005.

Pereira, R.L.; Leites, F.I.; Paese, K.; Sponchiado, R.M.; Michalowski, C.B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E.S. Hydrogel containing adapalene- and dapson-loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, in vitro irritation and permeation studies, *Drug Dev. Ind. Pharm*. 42:2001–2008. 2016.

Pimentel, F.A.; Souza, M.M.M.; Sá, C.P.; Cabral, W.G.; Silva, M.R.; Pinheiro, P.S.N.; Bastos, R.M. *Recomendações básicas para o cultivo da pimenta longa (Piper hispidinervium) no Estado do Acre*. 1st edition. Rio Branco:Embrapa-CPAF/AC. 1-17p. 1998.

Pinheiro, B.G.; Silva, A.S.; Souza, G.E.; Figueiredo, J.G.; Cunha, F.Q.; Lahlou, S.; Silva, J.K.; Maia, J.G.; Sousa, P.J. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of Ethnopharmacology*, 8: 479-86. 2011.

Pinheiro, J. O. P.; Aragão, T. E.; Santos, S.; Juliana, F.; Maria, Y.; Gomes, B.; Rhayanny, M.; Antunes, A. 2017. Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne)

Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 2388. 2017.

Potzernheim, L.C.M.; Bizzo, R.H.; Silva, P.J.; Vieira, F.R. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46: 25-31. 2012.

Prakash, A.; Vadivel, V.; Rubini, D.; Nithyanand, P. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella typhimurium*. *Food Bioscience*, 28: 57–65. 2019.

Rakmai, J.; Cheirsilp, B.; Mejuto, C.J.; Torrado-Agrasar, A.; Simal-Gandara, J. Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 65: 157-164. 2017.

Raut, J.S.; Karuppayil, S.M. A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, 62: 250-264. 2014.

Rali, T.; Wossa, S.W.; Leach, D.N.; Waterman, P.G. Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea, *Molecules*. 12:89–394. 2007.

Rai, V.K.; Mishra, N.; Yadav, K.S.; Yadav, N.P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications, *J. Control. Release*. 270:203–225. 2018.

Ravi Kumar, M.N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharm. Sci*. 3: 234–258. 2000.

Rodenak-Kladniew B.; Islan, A.G.; Bravoa, G.M.; Durán, N.; Castro, R.G. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154: 123–132. 2017.

Roberts, M.S.Y.; Mohammed, M.N. Pastore, S. Namjoshi, S. Yousef, A. Alinaghi, I.N. Haridass, E. Abd, V.R. Leite-Silva, H.A.E. Benson, J.E. Grice, Topical and cutaneous delivery using nanosystems, *J. Control. Release*. 247:86–105. 2017.

Rukachaisirikul, T.; Siriwattanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P.; Wongwattanavuch, P.; Suksamrarn, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93:173-176. 2004.

Salehi, B.; Zakaria, A. Z.; Gyawali, R.; Ibrahim, A. S.; Rajkovic, J.; Shinwari, K. Z.; Khan, T.; Rad-Sharifi, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; Valussi, M.;Tumer, B. T.; Fidalgo, M. L.; Martorell, M.;Setzer, N. W. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*, 24:1364, 2019.

Salehi, B.; Zakaria, A. Z.; Gyawali, R.; Ibrahim, A. S.; Rajkovic, J.; Shinwari, K. Z.; Khan, T.; Rad-Sharifi, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; Valussi, M.;Tumer, B. T.; Fidalgo, M. L.;

Martorell, M.; Setzer, N. W. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*, 24:1364, 2019.

Salvi, R. V.; Pawar, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51:255–267, 2019.

Santos, A.S.; Andrade, A.H.E.; Zoghbi, B.G.M.; Luz, R.I.A.; Maia, S.G.J. Sesquiterpenes of Amazonian *Piper* species. *Acta Amazonica*, 28: 127-130. 1998.

Santos, M.R.A.; Lima, R.A.; Fernandes, C.F.; Silva, A.G.; Facundo, V.A. Antifungal Activity of *Piper marginatum* L. (Piperaceae) Essential Oil against *Fusarium oxysporum* (Schlecht). *Revista Saúde e Pesquisa*, 4: 9-14. 2011.

Santos, S.P.; Souza, M.K.L.; Araujo, L.S.T.; Medeiros, R.V.J.; Nunes, C.C.S.; Veiga, J.B.F.; Figueiras, A. Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. *ACS Omega*, 2: 9080–9094. 2017.

Santos, T.G.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Guedes, A.; Gasper, A.L.; Cruz, A.B.; Schmit, A.P.; Cruz, R.C.B.; Steindel, M.; Nunes, R.K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (c. Presl.) C. Dc. *Química Nova*, 35: 477-481. 2012.

Sauter, I.P.; Rossa, G.E.; Lucas, A.M.; Cibulski, S.P.; Roehe, P.M.; Silva, L.A.A.; Rott, M.B.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E.; Poser, G.L.V. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*, 40: 292-295. 2012.

Shakeel, F.; Shazly, G.A.; Mohammad, R.; Ahmad, A.; Kalam, M.A.; Ali, N.; Ansari, M.A.; Elosaily, G.M. Biological investigation of a supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery system of *Piper cubeba* essential oil. *RSC Advances*, 5: 105-206. 2015.

Shi, F.; Zhao, Y.; Firempong, C. K.; Xu, X. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers. *Pharmaceutical Biology*, 54:2320–2328. 2016.

Sutradhar, K.B.; Amin, L. Nanoemulsions: Increasing possibilities in drug delivery, *Eur. J. Nanomedicine*. 5:97–110. 2013.

Singh, Y.; Meher, J.G.; Raval, K.; Khan, F.A.; Chaurasia, M.; Jain, N.K.; Chourasia, M.K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *J. Control. Release*. 252:28–49. 2017.

Silva, J. A. et al. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2009.

Silva, D.R.; Baroni, S.; Svidzinski, A.E.; Bersani-Amado, C.A.; Cortez, D.A.G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 569-573. 2008.

Silva, E.M.J.; Machado, S.R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 22: 117-124. 1999.

Silva Gündel, S.; de Souza, M.E.; Quatrin, P.M.; Klein, B.; Wagner, R.; Gündel, A.; de A. Vaucher, R.C.V. Santos, A.F. Ourique, Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities, *Microb. Pathog.* 118:268–276. 2018.

Silva, H.M.M.D.; Bastos, N.C. Atividade Antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 143-145. 2007.

Silva, J.K.; Pinto, L.C.; Burbano, R.M.R.; Montenegro, R.C.; Guimarães, E.F.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. 58: 55-60, 2014.

Silva, K. J.; Trindade, R.; alves, S. N.; Figueiredo, L. P.; Maia, G. J.; Setzer, N. W. Essentials Oils from Neotropical *Piper* Species and Their Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:2571, 2017.

Silva, W.C.; Martins, J.R.S.; Souza, H.E.M.; Heinzen, H.; Cesio, M.V.; Mato, M.; Albrecht, F.; Azevedo, J.L.; Barros, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 164: 267-274. 2009.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6th edition. Porto Alegre: Editora da UFRGS.103-105p. 2007.

Simpson, B.B.; Ogorzaly, M.O. *Economic Botany: plants in our world*. 2nd. edition. New York: McGraw-Hill. 78-79p. 1995.

Singh V, Sharma H, Veerma R, Javed A, Singh M. Topical non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) microemulsions: Rationale, review and future prospective. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 7, p. 1-7, 2013.

Smith, R.M.; Kassim, H. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji, *NZ J. Sci.* 22: 127. 1979.

Souto, R.N.P.; Harada, A.Y.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (smith) (hymenoptera: formicidae). *Neotropical Entomology*, 41: 510-517. 2012.

Souza, V. C., Lorenzi, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. 2nd. edition. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 56p. 2005.

Stevens, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Accessed on 20/12/2019. 2012.

Strickley, R. G.; Oliyai, R. Solubilizing vehicles for oral formulation development. In: Augustijns, N. S.; Brewster, M. E. Solvent Systems and their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics. New York, NY: Springer New York, 2007.

Taylor, D.W.; Hickey, L.J. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. *Plant Systematic Evolution*, 180: 137-156. 1992.

Tripathi, A.K.; Jain, D.C.; Kumar, S. Secondary metabolites and their biological and medicinal activities of Piper species plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 18: 302-321. 1996.

Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12:40–53.2013.

Ujhelyi, Z. et al. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 3, p. 564–573, 2012.

Üner, M.;Yener, G.; Erguven, M.; Karaman, E.; Utku, E. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Celecoxib for Topical Application – Preparation, Characterization and Drug Penetration Through Rat Skin, *Curr. Nanosci.* 10:532–542. 2014.

Vargas, A.; Zeisser-Labouèbe, M.; Lange, N.; Gurny, R.; Delie, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:1162–1176. 2007.

Villone, D.; Fritsch, A.; Koch, M.; Bruckner-Tuderman, L.; Hansen, U.; Bruckner, P. Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: Anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils, *J. Biol. Chem.* 283:24506–24513. 2008.

Vila, R.; Tomi, F.; Mundina, M.; Santana, A.I.; Solís, P.N.; López Arce, J.B.; Balderrama Iclina, J.L.; Iglesias, J.; Gupta, M.P.; Casanova, J.; Cañigüeral, S. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*, *Flavour Fragr. J.* 20:67–69. 2005.

Vilhena, S.C.; Nascimento, S.A.L.; Andrade, A.H.E.; Silva, R.K.J.; Hamoy, J.; Torres, F.M.; Barbas, L.A.L. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 510: 169–175. 2019.

Villegas, L.F.; Marçalo, A.; Martin, J.; Fernández, I.D.; Maldonado, H.; Vaisberg, A.J.; Hammond, G.B. (+)-epi-alfa-bisbolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. *Journal of Natural Products*, 64: 1357-1359. 2001.

Vitorino, C.; Almeida, J.; Gonçalves, L.M.; Almeida, A.J.; Sousa, J.J.; Pais, A.A.C.C. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail, *J. Control. Release.* 167:301–314. 2013.

Volpe, H.X.L.; Fazolin, M.; Garcia, R.B.; Magnani, R.F.; Barbosa, J.C.; Miranda, M.P. Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. *Society of Chemical Industry* 72; 1242-1249, 2016.

Vogt, A.; Wischke, C.; Neffe, A.T.; Ma, N.; Alexiev, U.; Lendlein, A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges?, *J. Control. Release.* 242:3–15. 2016.

Walkenhorst, W.F. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1858: 926–935. 2016.

Wei, Y.; YE, X.; Peng, X. S. X.; Bao, Q.; Liu, M.; Manman, G.; Li, Fanzhu. Enhanced oral bioavailability of silybin by a supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 396, p. 22-28, 2012.

Yuncker, T.G. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* - Group I, II, III, IV. *Hoehnea*, 2: 19-366. 1972.

Zacaroni, L.M.; Cardoso, M.G.; Souza, P.E.; Pimentel, F.A.; Guimaraes, G.; Salgado, A.P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazonica*, 39: 193-198. 2009.



Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches

Simone Braga Carneiro ¹, Fernanda Ílary Costa Duarte ², Luana Heimfarth ³,
Jullyana de Souza Siqueira Quintans ³, Lucindo José Quintans-Júnior ³,
Valdir Florêncio da Veiga Júnior ⁴ and Ádley Antonini Neves de Lima ^{2,*}

¹ Chemistry Department, Amazonas Federal University, Av. Rodrigo Octavio, 6200, Manaus AM 69080-900, Brazil; Braga.simone.c@gmail.com

² Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59012-570, Brazil; fernandailary@gmail.com

³ Laboratory of Neuroscience and Pharmacological Assays (LANEF), Federal University of Sergipe, São Cristóvão SE 49100-000, Brazil; luahei@yahoo.com.br (L.H.); jullyanaquintans@gmail.com (J.d.S.S.Q.); lucindojr@gmail.com (L.J.Q.-J.)

⁴ Military Institute of Engineering, Praça General Tiburcio, 80, Praia Vermelha, Rio de Janeiro RJ 22290-290, Brazil; valdir.veiga@gmail.com

* Correspondence: adleyantonini@yahoo.com.br; Tel.: +55-84-99928-8864~

Received: 20 November 2018; Accepted: 27 December 2018; Published: 2 February 2019

Abstract: This review aims to provide a critical review of the biological performance of natural and synthetic substances complexed with cyclodextrins, highlighting: (i) inclusion complexes with cyclodextrins and their biological studies in vitro and in vivo; (ii) Evaluation and comparison of the bioactive efficacy of complexed and non-complexed substances; (iii) Chemical and biological performance tests of inclusion complexes, aimed at the development of new pharmaceutical products. Based on the evidence presented in the review, it is clear that cyclodextrins play a vital role in the development of inclusion complexes which promote improvements in the chemical and biological properties of the complexed active principles, as well as providing improved solubility and aqueous stability. Although the literature shows the importance of their ability to help produce innovative biotechnological substances, we still need more studies to develop and expand their therapeutic properties. It is, therefore, very important to gather together evidence of the effectiveness of inclusion complexes with cyclodextrins in order to facilitate a better understanding of research on this topic and encourage further studies.

Keywords: cyclodextrins; substances; inclusion complexes; pharmaceutical technology; biological assays; drug delivery

ANEXO 2

PATENTE



22/01/2019 870190006590
11:37



29409161800192508

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 001202 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24365710000183

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N

Cidade: Natal

Estado: RN

CEP: 59072-970

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: nit@reitoria.ufrn.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 04378626000197

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Avenida General Rodrigo Otávio, nº 6200, Coroado

Cidade: Manaus

Estado: AM

CEP: 69077-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MICROEMULSÃO COM DILAPIOL COM AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA

Resumo: A presente patente refere-se a processo de obtenção de microemulsão utilizando tensoativo não-iônico (PEG-8 glicerídeos cáprico/caprílico ou outros tensoativos não-iônicos com EHL na faixa 8-16, em 20% a 40%), fase oleosa (triglicerídeos de cadeia média 5% a 10%), miristato de isopropila (3% a 20%), Dilapiol (0,05% a 5%) e água (40% a 75%). A microemulsão feita com o fenilpropanóide Dilapiol, obtido do óleo essencial da espécie vegetal amazônica Piper aduncum, proporciona a este bioativo uma maior estabilidade, solubilidade aquosa e biodisponibilidade, bem como a melhoria da eficácia em sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Assim, propõe-se a utilização deste sistema microemulsionado para aplicação do Dilapiol para uso dessas formulações na terapêutica e nas áreas farmacêuticas e cosméticas.