

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Dominique Mesquita e Silva

**Estudo de penetração cutânea e desenvolvimento de formulações  
tópicas contendo estigmasterol e beta-sitosterol presentes na partição  
hexânica de *Pereskia aculeata***

JUIZ DE FORA

2023

Dominique Mesquita e Silva

**Estudo de penetração cutânea e desenvolvimento de formulações tópicas contendo estigmasterol e beta-sitosterol presentes na partição hexânica de *Pereskia aculeata***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Dominique Mesquita e Silva.

Estudo de penetração cutânea e desenvolvimento de formulações tópicas contendo estigmasterol e beta-sitosterol presentes na partição hexânica de Pereskia aculeata : Estudo de penetração cutânea e desenvolvimento de formulações tópicas contendo estigmasterol e beta-sitosterol presentes na partição hexânica de Pereskia aculeata / Dominique Mesquita e Silva Silva. -- 2023.  
102 f. : il.

Orientadora: Juliana de Carvalho da Costa da Costa

Coorientador: Guilherme Diniz Tavares Tavares

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Ora-pro-nobis. 2. Fitoesteróis. 3. Inflamação. 4. Tecnologia farmacêutica. 5. Penetração cutânea de fármacos. I. da Costa, Juliana de Carvalho da Costa , orient. II. Tavares, Guilherme Diniz Tavares , coorient. III. Título.

Dominique Mesquita e Silva

**Estudo de penetração cutânea e desenvolvimento de formulações tópicas contendo estigmasterol e beta-sitosterol presentes na partição hexânica de *Pereskia aculeata***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Aprovada em 15 de dezembro de 2023.**

BANCA EXAMINADORA

Dra. Juliana de Carvalho da Costa  
- Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Guilherme Diniz Tavares -  
Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Hudson Caetano Polonini  
Fagron – Holanda

Juiz de Fora, 16/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a), em 20/12/2023, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto](#)

[nº10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por Guilherme Diniz Tavares, Professor(a), em 20/12/2023, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por Elita Scio Fontes, Professor(a), em 21/12/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13](#)

[de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por Hudson Caetano Polonini, Usuário Externo, em 21/12/2023, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1579058 e o código CRC F0EA4DB9.

Dedico este trabalho aos meus pais com todo o meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e as forças divinas, por me guiar, iluminar e me dar forças para seguir em frente lutando pelos meus propósitos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e a Faculdade de Farmácia pela oportunidade de crescimento profissional, e a agência de fomento, FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Prof. Dra. Juliana de Carvalho da Costa, por acreditar em mim, por me acolher e estar sempre disponível, me incentivando a dar o meu melhor na busca por novos conhecimentos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares por me receber de portas abertas em seu laboratório, por seu apoio, disponibilidade e profissionalismo.

À Prof. Dra. Elita Scio Fontes por me receber em seu laboratório e a todos os membros do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB), pelo apoio inicial no preparo do extrato e partição.

À Prof. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela, por todo o apoio e colaboração nos ensaios de célula de Franz.

À Prof. Dra. Izabel Almeida Alves por me receber tão bem em seu laboratório e a todos os membros do laboratório de Farmacocinética e Farmacométrie da Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelos ensinamentos e colaboração no ensaio de metodologia alternativa à experimentação animal.

A todos os membros do Laboratório de Química Tecnológica (QUIMTEC), em especial a Carolina Neves, por todo o apoio dado aos ensaios de validação analítica. A todos os membros do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano), por estarem sempre dispostos e disponíveis a compartilhar seus conhecimentos, em especial a Natália, pela ajuda na realização das atividades em cultura de células.

À toda minha família, em especial a minha mãe Elisabete e o meu pai Domingos, por serem a minha base, sem a qual eu jamais poderia ter sonhado em chegar aonde estou hoje. Ao meu companheiro de vida Knut, por todo apoio, carinho e amor, que me faz querer sempre ser uma pessoa melhor.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para que esse trabalho se desenvolvesse de maneira tão positiva.

Meu muito obrigada!

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

*Albert Einstein*



## RESUMO

*Pereskia aculeata* Muller, conhecida popularmente como ora-pro-nobis, é amplamente estudada devido às suas propriedades terapêuticas. O efeito anti-inflamatório da espécie é conhecido na literatura e pode ser associado aos fitoesteróis beta-sitosterol ( $\beta$ -SIT) e estigmasterol (EST). Desse modo, o objetivo do trabalho foi desenvolver formulações tópicas contendo EST e  $\beta$ -SIT e realizar a avaliação da sua penetração cutânea. Para isso, o extrato hidrometanólico das folhas da *P. aculeata* foi produzido seguido do particionamento em hexano (PHEX). As substâncias isoladas EST e  $\beta$ -SIT foram quantificadas na PHEX. A citotoxicidade foi testada em células de fibroblastos L929, sendo que a PHEX não apresentou citotoxicidade na concentração de até 200  $\mu\text{g/mL}$ . Já o EST e o  $\beta$ -SIT não apresentaram citotoxicidade em concentrações de até 25  $\mu\text{g/mL}$ . Outro teste *in vitro* realizado foi a inibição do radical de óxido nítrico pelo método de Griess. Nesse teste a PHEX (200  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu 66% do radical de óxido nítrico. Já o EST e o  $\beta$ -SIT (25  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram 33,73% e 34,94%, respectivamente. Ensaio de toxicidade aguda *in vivo* foram realizados usando larvas *Zophobas morio*. O cálculo da  $DL_{50}$  foi obtido por meio da curva dose-resposta, sendo 229,6 mg/kg para PHEX, 101,5 mg/kg para EST e 103,8 mg/kg para  $\beta$ -SIT. Duas formulações tópicas, gel-creme e filme tópico foram desenvolvidas para incorporação do EST e  $\beta$ -SIT. Logo após, foi realizado o desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do EST e  $\beta$ -SIT utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector Ultravioleta *Diode-Array* (CLAE-UV-DAD). O método analítico foi seletivo, linear, preciso e exato. Ademais, foi capaz de recuperar o EST e  $\beta$ -SIT da pele de orelha de porco. Em seguida, foi realizada a avaliação da penetração cutânea *ex vivo* em célula de difusão vertical de Franz, utilizando pele de orelha de porco. De acordo com os resultados de penetração cutânea,  $\beta$ -SIT penetrou na epiderme viável e derme 2,5 vezes mais no filme tópico do que no gel-creme ( $44,16 \pm 19,69$  vs  $17,65 \pm 15,68 \mu\text{g/cm}^2$ ). Assim, até o momento, esse é o primeiro estudo que avaliou a penetração cutânea do EST e  $\beta$ -SIT em formulações.

Palavras-Chave: Ora-pro-nobis. Fitoesteróis. Inflamação. Tecnologia farmacêutica. Penetração cutânea de fármacos.

## ABSTRACT

*Pereskia aculeata* Muller, commonly known as ora-pro-nobis, is widely studied due to its therapeutic properties. The anti-inflammatory effect of the species is known in the literature and can be associated with the phytosterols beta-sitosterol ( $\beta$ -SIT) and stigmasterol (EST). Therefore, the objective of this study was to develop topical formulations containing EST and  $\beta$ -SIT and evaluate their skin penetration. For this, the hydromethanolic extract of *P. aculeata* leaves was produced followed by partitioning in hexane (PHEX). The isolated substances EST and  $\beta$ -SIT were quantified in the PHEX. Cytotoxicity was evaluated in L929 fibroblast cells, and PHEX did not show cytotoxicity at concentrations of up to 200  $\mu\text{g/mL}$ . EST and  $\beta$ -SIT did not show cytotoxicity at concentrations of up to 25  $\mu\text{g/mL}$ . Another *in vitro* test carried out was the inhibition of the nitric oxide radical using the Griess method. In this test, PHEX (200  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited 66% of the nitric oxide radical. EST and  $\beta$ -SIT (25  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited 33.73% and 34.94%, respectively. *In vivo* acute toxicity assays were performed using *Zophobas morio* larvae. The LD50 calculation was obtained using the dose-response curve, being 229.6 mg/kg for PHEX, 101.5 mg/kg for EST and 103.8 mg/kg for  $\beta$ -SIT. Two topical formulations, gel-cream and topical film, were developed to incorporate EST and  $\beta$ -SIT. Thereafter, the development and validation of the analytical method for quantification of EST and  $\beta$ -SIT was carried out using High-performance Liquid Chromatography coupled with the Ultraviolet Diode-Array Detector (HPLC-UV-DAD). The analytical method was selective, linear, precise, and accurate. Furthermore, it was able to recover EST and  $\beta$ -SIT from the pig ear skin. Ex vivo skin penetration was assessed in Vertical Franz Diffusion Cells, using pig ear skin. According to the skin penetration results,  $\beta$ -SIT penetrated into the viable epidermis and dermis 2.5 times more in the topical film than in the gel-cream ( $44.16 \pm 19.69$  vs  $17.65 \pm 15.68$   $\mu\text{g/cm}^2$ ). Thus, to date, this is the first study that evaluated the skin penetration of EST and  $\beta$ -SIT in formulations.

Keywords: Ora-pro-nobis. Phytosterols. Inflammation. Pharmaceutical technology. Skin penetration of drugs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas da <i>Pereskia aculeata</i> .....	21
Figura 2 - Estrutura química dos metabólitos secundários encontrados na partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> .....	22
Figura 3 - Rota biossintética dos fitoesteróis campesterol, beta-sitosterol e estigmasterol.....	23
Figura 4 - Camadas da pele, epiderme, derme e hipoderme e seus anexos cutâneos .....	25
Figura 5 - Vias de penetração cutânea .....	27
Figura 6 - Comparativo de absorção cutânea em 3 formas farmacêuticas diferenciadas .....	28
Figura 7 - Laminador farmacêutico.....	33
Figura 8 - <i>Film Casting Knife</i> .....	34
Figura 9 - Esquema de formação de filmes tópicos poliméricos <i>in situ</i> .....	34
Figura 10 - Fluxograma da obtenção da amostra pela extração e particionamento ..	37
Figura 11 - Terceira vértebra posição ventral de larvas <i>Zophobas morio</i> .....	41
Figura 12 - Larvas acondicionadas com comida e água <i>ad libitum</i> .....	41
Figura 13 - Dispositivo para laminação dos filmes tópicos.....	45
Figura 14 - Esquema de preparo de filmes tópicos pelo método de evaporação por solvente.....	47
Figura 15 - Célula de difusão do tipo <i>Franz</i> montada com a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do receptor.....	52
Figura 16 - Filmes tópicos com beta-sitosterol 6%.....	53
Figura 17 - Cromatogramas da partição hexânica obtido por meio de CLAE-UV-DAD .....	56
Figura 18 - Viabilidade celular das células L929 da partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> e os compostos puros estigmasterol e beta-sitosterol .....	59
Figura 19 - Inibição do radical de óxido nítrico da PHEX <i>Pereskia aculeata</i> , estigmasterol e beta-sitosterol.....	61
Figura 20 - Curvas doses-resposta da toxicidade de estigmasterol, beta-sitosterol e partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> .....	62
Figura 21 - Gel-creme com estigmasterol e beta-sitosterol incorporados na concentração de 6%.....	67

Figura 22 - Formulação F6 no estado líquido e sólido .....	69
Figura 23 - Filme tópico com beta-sitosterol 6% .....	71
Figura 24 - Cromatogramas CLAE-UV-DAD (210 nm). Padrões (1) colesterol, (2) estigmasterol (3) beta-sitosterol a 50 µg/mL .....	73
Figura 25 - Sobreposição dos cromatogramas referente à injeção de uma solução de estigmasterol e beta-sitosterol em metanol, pele de orelha de porco com estrato córneo e branco das formulações gel-creme e filme tópico .....	75
Figura 26 - Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE-UV-DAD para as soluções de estigmasterol em metanol (A) e beta-sitosterol em metanol (B) na faixa de concentração entre 3,125 a 200 µg/mL.....	76
Figura 27 - Penetração cutânea do estigmasterol e beta-sitosterol em gel-creme, após 24 horas .....	81
Figura 28 - Penetração cutânea do beta-sitosterol no filme tópico e no gel-creme, após 24 horas .....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de substâncias ativas usadas no preparo de filmes tópicos .....	30
Tabela 2 - Grupos experimentais de <i>Zophobas morio</i> .....	42
Tabela 3 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados .....	42
Tabela 4 - Composição das formulações testadas de gel-creme.....	44
Tabela 5 - Composição qualitativa gel-creme .....	44
Tabela 6 - Composição das formulações testadas do filme tópico.....	46
Tabela 7 - Composição qualitativa filme tópico .....	46
Tabela 8 - Concentrações das porcentagens de recuperação .....	51
Tabela 9 - Massa e rendimento do extrato bruto metanólico e partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> .....	55
Tabela 10 - Teor de estigmasterol e beta-sitosterol na partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> .....	57
Tabela 11 - Resultados da dose letal 50% do estigmasterol, beta-sitosterol, e partição hexânica de <i>Pereskia aculeata</i> .....	63
Tabela 12 - Solubilidade da partição hexânica, estigmasterol e beta-sitosterol em diferentes solventes .....	64
Tabela 13 - Propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol calculados por meio de modelagem molecular <i>SwissADME</i> .....	65
Tabela 14 - Avaliação das características organolépticas e pH do gel-creme .....	66
Tabela 15 - Avaliação das características organolépticas dos filmes poliméricos.....	68
Tabela 16 - Cálculo peso médio dos filmes tópicos .....	70
Tabela 17 - Otimização das condições cromatográficas para a quantificação do estigmasterol e beta-sitosterol retidos na pele .....	73
Tabela 18 - Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de estigmasterol em metanol .....	77
Tabela 19 - Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de beta-sitosterol em metanol. ....	78
Tabela 20 - Dados encontrados de limite de detecção e limite de quantificação para a quantificação do estigmasterol e beta-sitosterol em metanol. ....	79
Tabela 21 - Dados obtidos pela recuperação de estigmasterol em pele de orelha de porco .....	80

Tabela 22 - Dados obtidos pela recuperação de beta-sitosterol em pele de orelha de porco .....	80
--	----

## LISTA DE SIGLAS

PHEX	Partição hexânica
EBM	Extrato bruto metanólico
EST	Estigmasterol
$\beta$ -SIT	Beta-sitosterol
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1	Interleucina 1
ROS	Espécie reativa de oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
$\cdot$ OH	Radicais de hidrogênio
-OH	Íons hidroxila
$\cdot$ O <sub>2</sub>	Ânions superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
NO	Óxido nítrico
ONOO	Peroxinitritos
OCl	Hipoclorito
TNFR	Receptor de TNF
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas
CAS	Enzima cicloartenol sintase
SSR2	Enzimas de ramificação esterol redutase 2
SMT1	Esterol metil transferase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
mRNA	RNA mensageiro
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase reduzida
LPS	Lipopolissacarídeos
NF-KB	Fator nuclear kappa B
ERK	Sinal extracelular
p38	Proteína 38 quinase
EC	Etrato córneo
EV	Epiderme viável
UV	Ultravioleta

<i>log P</i>	Coeficiente de partição
IFA	Insumo farmacêutico ativo
FF	Forma farmacêutica
PVP	Polivinilpirrolidona
PVA	Álcool polivinílico
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HPC	Hidroxipropilcelulose
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
SFB	Soro fetal bovino
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
NPS	Nitroprussiato de sódio
MTT	Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio
L929	Linha celular de fibroblastos de camundongo
AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
DL <sub>50</sub>	Dose letal 50%
PM	Peso molecular
LH	Ligações de hidrogênio
log KP	Coeficiente de permeabilidade
BHT	Butilhidroxitolueno
FC	Fator de correção
PEG	Poli(et)ilenoglicol
T80	Tween 80
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
HaCat	Células de queratinócitos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
DPR	Desvio padrão relativo
CV	Coeficiente de variação
LD	Limite de detecção



LQ	Limite de quantificação
SQR	Substância de pureza conhecida
UPLC-QToF	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo <i>time-of-flight</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
2.1	INFLAMAÇÃO	19
2.2	ESPÉCIE <i>PERESKIA ACULEATA</i>	21
2.3	FITOESTERÓIS: ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL	22
2.4	PENETRAÇÃO CUTÂNEA	24
2.4.1	Anatomia e estrutura da pele	24
2.4.2	Vias de penetração cutânea	26
2.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA	27
2.6	FILMES TÓPICOS	29
2.6.1	Composição de um filme tópico	29
2.6.2	Substâncias ativas	29
2.6.3	Polímeros filmógenos	31
2.6.4	Plastificantes	31
2.6.5	Solventes	32
2.6.6	Conservantes e antioxidantes	32
2.6.7	Agentes promotores de permeação	32
2.6.8	Técnicas de preparo	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1	MATERIAL VEGETAL	37
4.1.2	Preparo do extrato bruto e partição hexânica	37
4.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	38
4.2.1	Cultura celular	38
4.2.1.1	Ensaio de viabilidade celular	38
4.2.2	Ensaio de inibição do radical de óxido nítrico	39
4.3	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	40

<b>4.3.1</b>	<b>Ensaio de toxicidade aguda em larvas de <i>Zophobas morio</i></b> .....	<b>40</b>
4.4	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES .....	42
<b>4.4.1</b>	<b>Determinação da solubilidade da PHEX, estigmasterol e beta-sitosterol</b>	<b>42</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Determinação das propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Procedimento de preparo das formas farmacêuticas</b> .....	<b>43</b>
4.4.3.1	<i>Procedimento de preparo gel-creme</i> .....	43
4.4.3.2	<i>Procedimento de preparo filme tópico</i> .....	45
4.4.3.2.1	Determinação do peso médio dos filmes .....	47
4.4.3.2.2	Determinação do fator de correção (FC) .....	47
4.5	MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESTIGMASTEROL BETA-SITOSTEROL EM FORMULAÇÕES E NA PELE .....	48
<b>4.5.1</b>	<b>Validação do método analítico</b> .....	<b>48</b>
4.5.1.1	<i>Seletividade</i> .....	48
4.5.1.2	<i>Linearidade</i> .....	49
4.5.1.3	<i>Precisão e exatidão</i> .....	49
4.5.1.4	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	50
4.5.1.5	<i>Recuperação</i> .....	50
4.6	ESTUDO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA <i>EX VIVO</i> DO ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS .....	52
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
5.1	RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E PARTIÇÃO HEXÂNICA .....	55
5.2	QUANTIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL NA PARTIÇÃO HEXÂNICA DE PERESKIA ACULEATA .....	56
5.3	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	58
<b>5.3.1</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular</b> .....	<b>58</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação da inibição do radical de óxido nítrico</b> .....	<b>60</b>

5.4 ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	62
5.4.1 Toxicidade <i>in vivo</i> em larvas de <i>Zophobas morio</i> .....	62
5.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO .....	63
5.5.1 Avaliação da solubilidade.....	64
5.5.2 Avaliação das propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol .....	65
5.5.3 Otimização da formulação gel-creme .....	66
5.5.4 Otimização da formulação filme tópico .....	68
5.5.4.1 Avaliação do peso médio do filme inerte .....	70
5.5.4.2 Determinação do fator de correção .....	70
5.5.4.3 Incorporação do beta-sitosterol no filme tópico .....	71
5.6 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL NAS FORMULAÇÕES E NA PELE .....	71
5.6.1 Otimização das condições cromatográficas.....	71
5.6.2 Validação analítica .....	74
5.6.2.1 Seletividade .....	75
5.6.2.2 Linearidade .....	76
5.6.2.3 Precisão e Exatidão.....	77
5.6.2.4 Limite de detecção e Limite de quantificação .....	79
5.6.2.5 Recuperação.....	79
5.7 ESTUDO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA <i>EX VIVO</i> .....	80
6 CONCLUSÃO .....	85
REFERÊNCIAS.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com aproximadamente 20% da flora mundial, possuindo grandes perspectivas para exploração econômica da biodiversidade, e despertando o interesse por projetos de pesquisa e desenvolvimento de metodologias terapêuticas com produtos naturais (DA ROCHA *et al.*, 2021; ZUANAZZI, 2010).

Fazendo parte da ampla variedade de plantas terapêuticas do Brasil, a espécie *Pereskia aculeata* Miller, pertencente à família Cactaceae e com vasta distribuição na região da Mata Atlântica, tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial terapêutico (DE FREITAS *et al.*, 2021). As folhas de *P. aculeata* possuem utilização na medicina popular e são conhecidas por tratarem distúrbios renais, cicatrizes na pele, propriedades anti-inflamatórias e função hidratante (GARCIA *et al.*, 2019).

Até o momento, estudos indicam que *P. aculeata* possui notável potencial para o tratamento de doenças inflamatórias da pele apresentando ao mesmo tempo atividades anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante e hidratante, ao contrário dos produtos disponíveis no mercado. Suas ações são potentes, diferenciando-se dos fitoterápicos já disponíveis. Além disso, comparando-se aos principais anti-inflamatórios cutâneos (glicocorticoides), possuem baixo risco de efeitos adversos (PINTO *et al.*, 2015b).

O efeito anti-inflamatório da espécie está associado aos fitoesteróis, como beta-sitosterol e estigmasterol metabólitos secundários predominantes na *P. aculeata*. Eles são compostos bioativos encontrados em vegetais, que possuem estruturas idênticas a do colesterol, que demonstram atividade pelos receptores de glicocorticoides, obtendo ação similar aos anti-inflamatórios esteroidais sintéticos (AKINLOYE *et al.*, 2020).

O desenvolvimento tecnológico é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de uma formulação (GUILHERMINO *et al.*, 2012). Nesta fase, deverão ser realizados a caracterização das propriedades físico-químicas, compatibilidade com os excipientes e adjuvantes utilizados, estudos de solubilidade e biodisponibilidade, padronização da formulação, metodologias para controle de qualidade e estudos de segurança e eficácia (DERUYVER *et al.*, 2021).

Para a avaliação da segurança de produtos dermatológicos, análises de permeação/penetração cutânea em células de difusão vertical tipo Franz são

amplamente utilizadas devido à sua capacidade de avaliar a influência da forma farmacêutica na distribuição das substâncias ativas através das camadas da pele (DE OLIVEIRA et al., 2020). Desse modo, o conhecimento do transporte através da pele torna-se essencial para otimização da liberação tópica de diferentes formas farmacêuticas (KATHE; KATHPALIA, 2017).

Mediante aos fatos supracitados, o presente trabalho apresentou como objetivo principal o desenvolvimento de formulações tópicas contendo os principais fitoesteróis da *P. aculeata*, EST e  $\beta$ -SIT, e a avaliação da penetração cutânea nas formas farmacêuticas desenvolvidas contendo os mesmos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 INFLAMAÇÃO

O conceito de inflamação abrange a resposta de defesa do organismo frente a agentes externos. A invasão de patógenos na corrente sanguínea representa uma ameaça ao hospedeiro e pode desencadear uma série de respostas inflamatórias (MA; WILLEY, 2022). Durante o processo inflamatório, agentes agressores são reconhecidos por células do sistema imune, que levam a produção de mediadores pró-inflamatórios, promovendo a perturbação da barreira endotelial e acúmulo de neutrófilos no tecido inflamado (SEN'KOVA *et al.*, 2023).

O processo inflamatório nem sempre se relaciona a apenas um processo infeccioso. As doenças crônicas, autoimunes e câncer também podem estimular a inflamação (NEGISHI *et al.*, 2021). Além dessas doenças, a dermatite atópica e a psoríase, possuem relação com processos inflamatórios crônicos (LEE *et al.*, 2022).

Em termos gerais, os sinais clínicos da inflamação são caracterizados por danos celulares, sendo responsáveis por sintomas como dor localizada, edema, rubor, calor e com possível perda da função do tecido (IWALEWA *et al.*, 2007). Existem dois tipos de respostas inflamatórias, a primeira é a inflamação aguda e a segunda a inflamação crônica (RANG *et al.*, 2012). A resposta inflamatória aguda possui sinais como: aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, edema, dor localizada, migração dos leucócitos inflamatórios para o tecido, granulação e por último reparo tecidual (LIMA *et al.*, 2007). A inflamação crônica refere-se à inflamação de longa duração em casos em que a fase aguda não responde adequadamente ao reparo tecidual, geralmente associada à progressão de doenças crônicas (KUSUMAH; DE MEJIA, 2022).

O controle do processo inflamatório é realizado por meio de mediadores químicos que propagam distúrbios inflamatórios. Eles são derivados de células, podendo ser sintetizados no sítio da inflamação na presença do estímulo nocivo (MUDGAL *et al.*, 2014). Os mediadores químicos mais conhecidos são aminas vasoativas compostas (histamina e serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos) e as citocinas que são constituídas por fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SERHAN, 2006).

A inflamação está diretamente relacionada ao estresse oxidativo, que consiste em um desequilíbrio entre a geração de agentes oxidantes e neutralizantes, perturbando a homeostase. As ROS são moléculas sinalizadoras chave que desempenham um importante papel no encadeamento de doenças inflamatórias (ZHENG *et al.*, 2023). Elas englobam uma família de espécies reativas como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais de hidrogênio ( $\cdot OH$ ), íons hidroxila ( $^-OH$ ), ânions superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), óxido nítrico (NO), peroxinitritos (ONOO) e hipoclorito (OCI). As ROS são instáveis e de curta duração, por serem capazes de mudar rapidamente de uma espécie para outra através de reações em cascata devido a presença de elétrons de valência e ligações instáveis (ZHOU *et al.*, 2023).

As principais células inflamatórias responsáveis pela liberação de ROS são os neutrófilos e macrófagos. Na inflamação aguda, as ROS derivadas de macrófagos e neutrófilos promovem a apoptose das células deterioradas e proporcionam a recuperação. Já na inflamação crônica, irão regular a via inflamatória pelo ligante do fator de necrose tumoral (TNF) e receptor de TNF (TNFR). O domínio citoplasmático do TNFR irá interagir com o gene RFL e a proteína p22phox e os NOXs são ativados. Dessa forma, as ROS são geradas pela conversão de  $O_2$  extracelular em  $O_2^-$  (HUANG *et al.*, 2021).

O método terapêutico comumente adotado para o tratamento da inflamação aguda e crônica envolve o uso de glicocorticoides. Quando o uso desses medicamentos é em doses mais baixas, geralmente não traz muitos malefícios. Porém, quando o uso é prolongado, como no caso da psoríase e dermatite atópica, podem acarretar efeitos adversos mais graves, como: infecções oportunistas, síndrome de Cushing, fraqueza muscular, osteoporose, hiperglicemia, úlcera péptica, entre outros (RANG *et al.*, 2012). Outro efeito adverso não menos importante, ocasionado por glicocorticoides tópicos é a atrofia da pele, causando afinamento, perda da elasticidade, facilidade de hematoma e aparecimento de estrias (LEE *et al.*, 2022).



## 2.2 ESPÉCIE *PERESKIA ACULEATA*

*P. aculeata* (sinonímia: *Pereskia*, *Pereskia* Karst.; *Cactus Pereskia* L.) é popularmente conhecida como “ora-pro-nobis”, mas também como lobrobrô, trepadeira-limão e “carne de pobre” (DUARTE; HAYASHI, 2005; GIRÃO *et al.*, 2003) (Figura 1). A planta é encontrada na América do Sul, predominante no Brasil, onde são distribuídas entre a região sul e nordeste (SOUZA *et al.*, 2016). É uma trepadeira arbustiva adaptada apenas a baixas altitudes e habita preferencialmente as orlas e clareiras de florestas (MORTON, 1987; ROSA; DA SOUZA, 2003).

Figura 1 - Folhas da *Pereskia aculeata*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

Essa espécie apresenta valor nutricional importante, dado ao alto teor de proteínas, ferro, cálcio, ácido ascórbico e ácido fólico presentes em suas folhas (CRUZ *et al.*, 2021). Além de serem utilizadas na alimentação humana, as folhas de *P. aculeata* são empregadas na medicina popular como emolientes, devido à alta produção de mucilagem, sendo utilizada em lesões de pele e na cicatrização de feridas em processos inflamatórios (CARVALHO *et al.*, 2014).

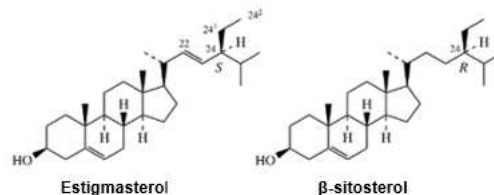
Na literatura, já existem estudos e formulações com essa função. De Barros *et al.* (2010) desenvolveram uma pomada anti-inflamatória e cicatrizante contendo as folhas de *P. aculeata*, e avaliaram as concentrações de 2% a 5%. Pinto *et al.* (2015b) desenvolveram um creme contendo a PHEX de *P. aculeata* nas concentrações de 6%

e 12%, que foi patenteada em 2021 (INPI BR 102015017575-2B1). Porém, em nenhuma dessas formulações, foram realizados testes de penetração cutânea *ex vivo*.

Com relação à constituição química das folhas, os seguintes metabólitos secundários já foram identificados:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2014), triptamina, mescalina, hordenina, petunidina, di-*tert*-butilfenol (PINTO *et al.*, 2015a), rutina, quercetina e ácido cafeico (CRUZ *et al.*, 2021). Porém, a maioria dos trabalhos de avaliação química possuem mais foco nos perfis de aminoácidos e fitoesteróis como EST,  $\beta$ -SIT e do flavonoide kaempferol (GARCIA *et al.*, 2019).

Pinto *et al.* (2015b) identificaram por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-MS) diversos compostos na PHEX de *P. aculeata*. Porém, a classe de metabólitos que prevaleceu foi a dos fitoesteróis, como: campesterol (8,97%), EST (6,89%) e  $\beta$ -SIT (24,66%) (Figura 2), além de fitol (4,51%), e os triterpenos taraxasterol (11,59%) e taraxerol (7,12%).

Figura 2 - Estrutura química dos metabólitos secundários encontrados na partição hexânica de *Pereskia aculeata*.



Fonte: Adaptado DEWICK (2009).

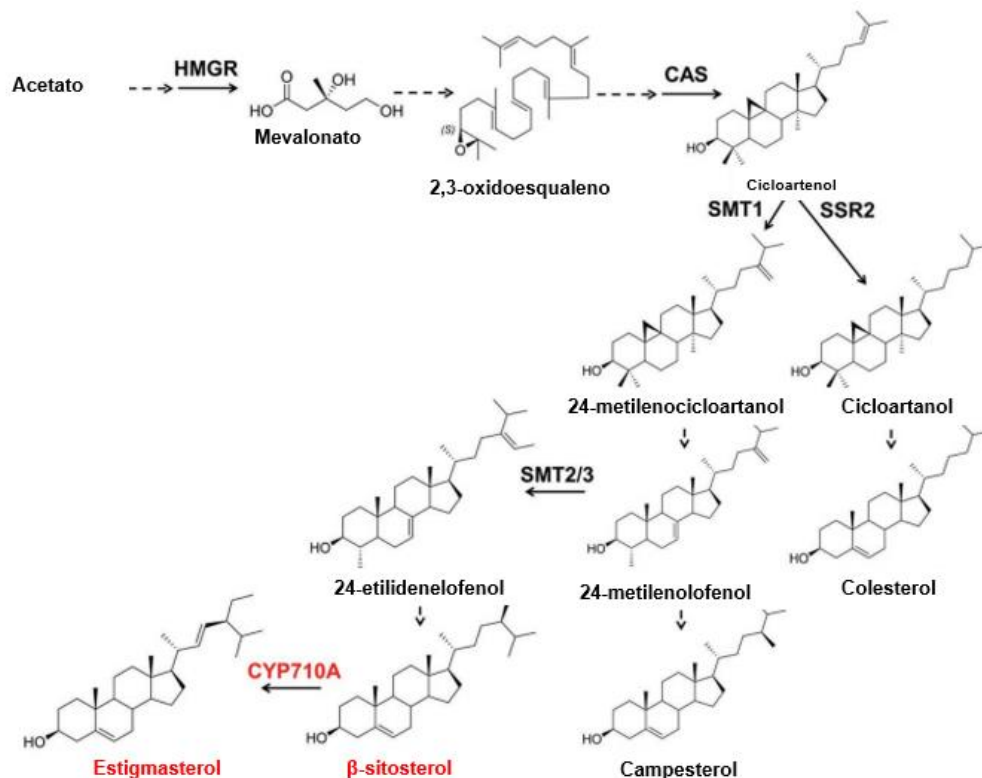
### 2.3 FITOESTERÓIS: ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL

Os fitoesteróis são um grupo de esteróis produzidos exclusivamente por plantas e fungos e desempenham um importante papel em vários processos biológicos. Suas principais funções são suporte e fluidez da membrana celular, precursores hormonais e estão envolvidos no estresse biótico e abiótico (ZHANG *et al.*, 2020, CABIANCA *et al.*, 2021). EST e  $\beta$ -SIT são os principais fitoesteróis presentes na membrana das células vegetais e possuem estrutura química semelhante, a diferença entre eles se

dá por uma insaturação na cadeia lateral da molécula (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003, KONGDUANG *et al.*, 2008).

O  $\beta$ -SIT e o EST são produzidos pela via do mevalonato através de uma sequência de reações catalisadas por enzimas que levam à produção do 2,3-oxidosqualeno (Figura 3). Logo após, ocorre a conversão pela enzima cicloartenol sintase (CAS) do 2,3-oxidosqualeno em cicloartenol, que é alvo de enzimas de ramificação esterol redutase 2 (SSR2) e esterol metil transferase 1 (SMT1). A SMT1 é a enzima responsável pela produção dos precursores de esteróis vegetais. Em seguida, enzimas SMT2/3, direcionam o carbono para o  $\beta$ -SIT e EST. O EST será produzido por uma reação de dessaturase que ocorre na posição C22 da cadeia lateral do esterol, catalisada pela enzima esterol C22-desaturase que pertence à família do citocromo P450 710 (ABOOCKER; SUZA, 2019, CABIANCA *et al.*, 2021).

Figura 3 - Rota biossintética dos fitoesteróis campesterol, beta-sitosterol e estigmasterol.



Fonte: Adaptado ABOOCKER; SUZA (2019).

Os fitoesteróis possuem diversas estruturas químicas que podem agir como agonistas e antagonistas de receptores esteroides, sugerindo uma série de atividades

biológicas (DEAN *et al.*, 2017). Suas propriedades biológicas mais conhecidas são, anti-hiperglicêmicos, anti-hipercolesterolêmicos, antioxidantes, antivirais e anti-inflamatórios (DI GIOIA; PETROPOULOS, 2019; PATIAL; SUD, 2022).

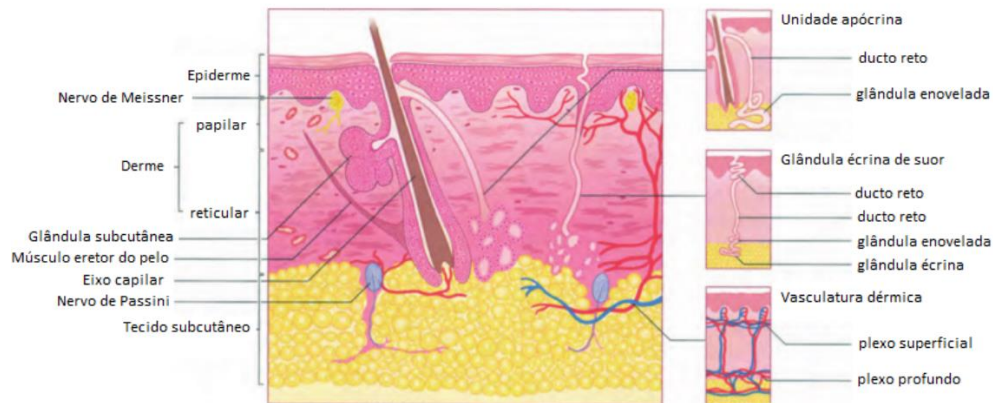
Dados reportados na literatura demonstram o efeito anti-inflamatório dos fitoesteróis. De acordo com Akinloye *et al.* (2020), essa importante classe de metabólitos pode inibir seletivamente a ciclooxigenase 2 (COX-2), por meio de pontes de hidrogênio e a regulação negativa da expressão de RNA mensageiro. Além disso, eles podem atuar reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios como IL-6 e iNOS, produzidos por lipopolissacarídeos (LPS), por meio da inibição da ativação das vias fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), quinase regulada por sinal extracelular e p38 quinase (TANG *et al.*, 2021). Outro estudo demonstrou a atividade anti-inflamatória do  $\beta$ -SIT, um dos fitoesteróis majoritariamente encontrados na PHEX da *P. aculeata* (Pinto *et al.*, 2015b), na supressão de fatores inflamatórios de queratinócitos e macrófagos induzidos por peptidoglicanos (PGN) ou LPS, como fator de necrose tumoral alfa TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e ROS (LIAO *et al.*, 2018).

## 2.4 PENETRAÇÃO CUTÂNEA

### 2.4.1 Anatomia e estrutura da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, relativamente complexa e multifuncional, exercendo múltiplas funções como proteção contra agentes externos, regulação de temperatura corporal, barreira para permeabilidade física e proteção ultravioleta (UV) (CHU, 2008; CHEN; FENG, 2022). Do ponto de vista anatômico, é um órgão heterogêneo que possui várias camadas biologicamente diferentes, apêndices, folículos pilosos e glândulas sebáceas. Do ponto de vista histológico, trata-se de um tecido epitelial escamoso queratinizado. Suas camadas principais são: estrato córneo (EC), epiderme viável (EV), derme e o tecido subcutâneo, também conhecido como hipoderme (Figura 4) (BIELFELDT *et al.*, 2022).

Figura 4 - Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme e seus anexos cutâneos.



Fonte: Adaptado KOLARSIK *et al.* (2011).

A epiderme é a principal barreira para permeabilidade, possui função imune e proteção UV. A derme possui a maior estrutura, com quatro componentes: matriz celular, matriz fibrosa, matriz difusora e filamentosa, composta por terminações vasculares, linfáticas e nervosas. A hipoderme possui o isolamento cutâneo por meio das células de gordura e contém vasos e nervos de origem, porém é uma área menos vascularizada (CHU, 2008; KOLARSIK *et al.*, 2011; HASANOVIC *et al.*, 2011).

O mecanismo de absorção cutânea pode ser determinado em três etapas: penetração, permeação e absorção. A penetração consiste na absorção de uma determinada substância, como um composto exógeno no EC; Já a permeação, a absorção de uma determinada substância é mais profunda através de mais camadas da pele; por último, a absorção, consiste no transporte de uma determinada substância no sistema vascular (BIELFELDT *et al.*, 2022).

Um dos principais desafios no que tange a absorção cutânea é a passagem da substância pelo EC, visto que é uma camada protetora da pele, com aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Dessa forma, o uso de aditivos, veículos e outros tipos de entrega de substâncias estão sendo desenvolvidas para ultrapassar essa barreira (LIU; LUNTER, 2021). Além do EC, vários fatores podem influenciar no processo de penetração cutânea, como: características do ativo (estado físico, tamanho molecular e coeficiente de partição); a própria pele, no que tange, gênero, etnia, local anatômico, hidratação e danos do EC; solubilidade, pH e adjuvantes utilizados no veículo e por último a dosagem de aplicação (WANG *et al.*, 2014; BIELFELDT *et al.*, 2022).

Pensando em um possível tratamento anti-inflamatório, é importante estabelecer a relação do processo inflamatório nas camadas da pele. O EC é a

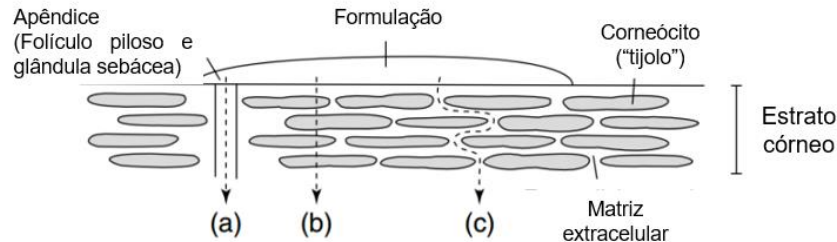
camada mais externa da pele, composta basicamente por corneócitos, que são células sem vida, sobrepostas por uma matriz lipídica (PRAÇA *et al.*, 2018). Geralmente, estudos que desejam investigar a ação anti-inflamatória de um composto utilizam pele com deficiência na barreira, através da remoção dos lipídeos do EC (LIN *et al.*, 2022; CHANG *et al.*, 2023). Já a epiderme viável também é avascular, composta principalmente por queratinócitos (95%), melanócitos e células de *Langerhans*. Os queratinócitos são responsáveis pela descamação e produção de queratina (NG; LAU, 2015; ELMOWAFY, 2021). No processo da inflamação, sinais pró-inflamatórios induzidos por ROS são produzidos nos queratinócitos e irão desempenhar um papel importante na imunorregulação de doenças como rosácea e psoríase (ZHANG *et al.*, 2023).

Uma das últimas camadas da pele é a derme, que é altamente vascularizada e composta por colágeno, elastina, fibroblastos, mastócitos e leucócitos (KREUTZ *et al.*, 2023). Citocinas pró-inflamatórias IL-17, IL-23 e TNF $\alpha$  são produzidas localmente na derme no processo inflamatório. As citocinas da família IL-32 e IL-1 irão desempenhar papéis críticos na inflamação dérmica (GNIADDECKI *et al.*, 2023).

#### **2.4.2 Vias de penetração cutânea**

A penetração cutânea de substâncias ocorre por difusão através do estrato córneo, difundindo-se pelas camadas da pele ou pelos apêndices, como glândulas sudoríparas e folículos pilosos (Figura 5) (MICHNIAK-KOHN *et al.*, 2005). Quando entram em contato com a superfície da pele, os compostos migram através de gradientes de concentração que determinam o processo de difusão de substâncias não carregadas através das membranas (SCHAEFER; REDELMEIER; LADEMANN, 2011).

Figura 5 - Vias de penetração cutânea.



Legenda: (a) a rota apendicular, (b) a rota transcelular e (c) a rota extracelular.

Fonte: Adaptado de NG; LAU (2015).

A importância dessas rotas para absorção cutânea irá depender de fatores como área, comprimento, difusividade e solubilidade dos compostos (NG; LAU, 2015). As rotas transcelular e extracelular referem-se ao transporte de substâncias através do EC ou entre eles, através da estrutura denominada “parede de tijolos”. Essas duas vias são limitadas a substâncias lipofílicas ( $\log P < 5$ ), com peso molecular abaixo de 500 Da (FRIEDMAN *et al.*, 2021). Em relação às moléculas hidrofílicas, possuem preferência por passar na via transcelular através dos corneócitos, porém as moléculas precisam passar por lipídeos intercelulares para realizar a travessia entre as células (BOLZINGER *et al.*, 2012).

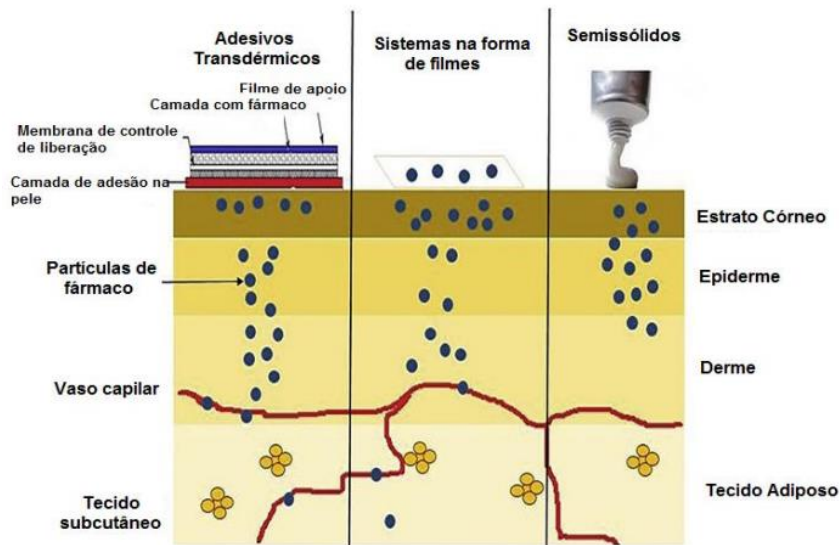
Na via de penetração apendicular, foi observado que nanopartículas abaixo de 320 nm mostraram uma penetração folicular eficiente em comparação com substâncias de tamanhos superiores. Os folículos capilares podem atuar como uma via de entrega de compostos e permitir uma penetração mais rápida que a intracelular (PATZELT *et al.*, 2008).

## 2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA

A via tópica é amplamente utilizada para tratar diversas condições da pele, sendo que formas farmacêuticas tópicos evoluíram de simples para sofisticados sistemas de administração de fármacos e isso se deve aos avanços nos estudos de absorção cutânea e design de produtos. A administração de fármacos por via tópica possui as seguintes etapas: transporte do IFA para um local alvo, liberação por

difusão, metabolismo, e a circulação dérmica para o restante do corpo e tecidos mais profundos (TAPFUMAYENI et al., 2022). A Figura 6 apresenta um comparativo de penetração cutânea de três formas farmacêuticas diferenciadas, para elucidar os sistemas de liberação tópica.

Figura 6 - Comparativo de absorção cutânea em 3 formas farmacêuticas diferenciadas.



Fonte: Adaptado KATHE; KATHPALIA (2017).

O sistema na forma de filmes funciona como um intermediário entre os adesivos transdérmicos e as demais formas farmacêuticas semissólidas. Eles podem propiciar absorção sistêmica ou liberação local. Já os *patches* transdérmicos possuem liberação controlada e a substância é absorvida pelos capilares e transportada até a circulação sistêmica. Os semissólidos convencionais possuem atividade na superfície da pele ou podem penetrar em camadas mais profundas como a epiderme e derme para atingir o seu local de ação (KATHE; KATHPALIA, 2017).

A penetração cutânea de cremes é mais comumente discutida na literatura quando comparada ao filme tópico. Em emulsões a fase externa determina a velocidade de liberação do fármaco, dessa forma, emulsões (O/A) podem apresentar liberação tópica mais rápida, já as formulações hidrofóbicas liberação mais lenta (GARCÊS et al., 2018). Já a liberação de substâncias em filmes poliméricos dependem da combinação do polímero e do plastificante utilizados, taxas de liberação maiores foram observadas em polímeros hidrofílicos, combinados com plastificantes hidrofóbicos (FREDERIKSEN et al., 2015).



## 2.6 FILMES TÓPICOS

A escolha da forma farmacêutica é uma etapa muito importante no processo de penetração cutânea, visto que a forma de liberação irá depender da forma farmacêutica utilizada (BRAIN *et al.*, 2007). Formas farmacêuticas tradicionais como cremes, pomadas e géis possuem várias limitações em relação a entrega de fármacos na pele, como imprecisão de dosagem, sendo facilmente retirados por contato com roupas e às vezes, sensação de pegajosidade, podendo levar à má adesão ao tratamento pelo paciente (KATHE; KATHPALIA, 2017).

Entre esses avanços das formulações tópicas estão os filmes poliméricos que apresentam um sistema de liberação tópica e surgem como uma nova abordagem em relação às formulações convencionais semissólidas (FREDERIKSEN *et al.*, 2015). Os filmes tópicos se destacam por serem de fácil aplicação, permitirem a liberação prolongada controlada do fármaco, além de garantirem maior adesão ao tratamento por serem capazes de diminuir a frequência de administração do medicamento (ROSSETO *et al.*, 2021).

### 2.6.1 Composição de um filme tópico

Para que um filme polimérico seja formado, os seguintes excipientes e adjuvantes são comumente utilizados: substâncias ativas (com fim farmacêutico ou cosmético), polímeros (naturais ou sintéticos), agentes plastificantes, solventes ou umectantes, antioxidantes, conservantes e agentes promotores de permeação (BAKHRUSHINA *et al.*, 2022).

### 2.6.2 Substâncias ativas

Os ativos de escolha para incorporação em filmes poliméricos podem ser hidrossolúveis, promovendo uma maior facilidade de incorporação junto aos demais excipientes dos filmes tópicos ou pouco solúveis em água, sendo sua incorporação um pouco mais desafiadora (KRULL *et al.*, 2017). Assim, para os ativos pertencentes à classificação biofarmacêutica II (solubilidade baixa e permeabilidade alta), técnicas de micronização e nanoencapsulamento podem ser empregadas, facilitando a

solubilidade em base polimérica e até mesmo a penetração do ativo no EC (NASERI *et al.*, 2019).

Dentre outras características a serem apresentadas pelas substâncias ativas para que haja uma maior penetração cutânea, podemos destacar: peso molecular < 500 Da, coeficiente de partição (*log P*) entre 1 e 3, além de não causar reações cutâneas irritantes e sensibilizantes (KATHE; KATHPALIA, 2017). Alguns dos principais ativos listados em literaturas científicas podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de substâncias ativas usadas no preparo de filmes tópicos.

	<b>Substância ativa</b>	<b>Componentes formadores dos filmes</b>	<b>Indicação terapêutica</b>	<b>Referências</b>
Evaporação do solvente (laminação)	Carreadores lipídicos nanoestruturados com Sinvastatina	HPMC, PEG 400, Sorbitol,	Tratamento de melanoma	BARONE <i>et al.</i> , 2019
	Ácido hialurônico	Alginato de sódio	Auxiliar na cicatrização de feridas	ABOU-OKEIL <i>et al.</i> , 2018
	Propranolol	PVA, Sorbitol, Plastoid E35H	Hemangioma infantil	PADULA <i>et al.</i> , 2019
	Hidrocortisona	Gelatina, glicerol	Dermatite atópica	VOSS <i>et al.</i> , 2020
Soluções poliméricas em spray	Própolis	Polaxamer 407, Carbopol 971P e 974P, Polycarbophil®	Anti-inflamatório, antimicrobiano e anticancerígeno	ROSSETO <i>et al.</i> , 2021
	Ropivacaína	Eudragit EPO, etanol	Dor crônica	RANADE <i>et al.</i> , 2017
	Meloxicam	Eudragit E100, Meglumina, Dimetilsulfóxido, etanol e mentol	Dor crônica (Artrite reumatoide e osteoartrite)	JYOTHI <i>et al.</i> , 2022
	Mometasona furoato	Eudragit, Trietil citrato, álcool isopropílico	Psoríase	LABELLA-LORITE <i>et al.</i> , 2020
	Betametasona valerato	Dermacryl, Eudragit, Trietilcitrato	Anti-inflamatório, dermatite atópica	FREDERIKSEN <i>et al.</i> , 2015

Voriconazol	Chitosana, PEG 400, Tween 80 e etanol	Infecções fúngicas (candidíase)	MUMTAZ <i>et al.</i> , 2022
-------------	---	------------------------------------	--------------------------------

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

### 2.6.3 Polímeros filmógenos

São os componentes principais de uma formulação de filmes tópicos e precisam apresentar características hidrofílicas, não tóxicas, não irritantes, boa espalhabilidade e propriedades mecânicas satisfatórias (LEE *et al.*, 2022). Podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outros polímeros formadores de filmes, sendo que sua concentração e características podem influenciar na liberação imediata ou controlada das substâncias (KARKI *et al.*, 2016).

São classificados como sintéticos, semissintéticos e naturais. A polivinil pirrolidona (PVP), o álcool polivinílico (PVA), a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a hidroxipropilcelulose (HPC) são os polímeros sintéticos mais comumente utilizados. Já o pullulan, a gelatina, o alginato de sódio e a quitosana, são os polímeros naturais mais empregados na produção de filmes tópicos (PACHECO *et al.*, 2021).

A preferência de utilização geralmente é por polímeros de origem natural, como por exemplo o pullulan, que possui potencialização do efeito cicatrizante da formulação, tendo sido confirmado por meio de estudos *in vivo* a capacidade em acelerar e regenerar a pele por meio do aumento de síntese de colágeno (THANGAVEL *et al.*, 2020). Outro polímero natural comumente utilizado é a quitosana, devido à sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (SAKWANICHOL *et al.*, 2019).

### 2.6.4 Plastificantes

São usados nos sistemas de formação de filme para conferir flexibilidade e melhorar a resistência à tração, favorecendo a difusão da água na matriz polimérica (CAO *et al.*, 2009). Devem ser compatíveis com os polímeros usados e possuírem baixa permeabilidade cutânea, como: glicerina, polietilenoglicol, sorbitol e citrato de tri etila (PACHECO *et al.*, 2021).

### **2.6.5 Solventes**

Possuem um importante papel para a formação dos filmes, de forma que os polímeros e as substâncias ativas sejam dispersos no sistema de solventes, contribuindo para a formação de superfícies poliméricas lisas e sem rugosidades, além da dispersão homogênea das substâncias ativas no meio (RANADE *et al.*, 2017). Levando em consideração os filmes tópicos, os tipos de solventes mais utilizados são: propilenoglicol, glicerina, miristato de isopropila, ácido oleico e etanol (KATHE; KATHPALIA, 2017).

### **2.6.6 Conservantes e antioxidantes**

A escolha dos conservantes, bem como sua concentração, deverá ser realizada seguindo os limites dos compêndios farmacêuticos ou órgãos reguladores, que estabeleçam as concentrações de conservantes para produtos cosméticos de higiene pessoal. Também deve ser levado em consideração a sua compatibilidade na base polimérica. Assim, conservantes como sorbato de potássio, ácido sórbico e benzoato de sódio são solúveis em água e são elegíveis para incorporação (TURKOVIC *et al.*, 2022).

### **2.6.7 Agentes promotores de permeação**

São utilizados com o propósito de entrega tópica de substâncias ativas com alto peso molecular e que apresentam dificuldade em ultrapassar a barreira do estrato córneo (YANG *et al.*, 2020). Em termos gerais, os promotores de permeação perturbam as barreiras lipídicas do estrato córneo, reduzindo sua resistência e permitindo que os ativos penetrem mais facilmente (TIAN *et al.*, 2021). Os promotores de permeação comumente utilizados são: Plurol<sup>®</sup> oleique CC497, Maisine<sup>®</sup> CC, Transcutol<sup>®</sup> P, miristato de isopropila e mentol (LIU *et al.*, 2019; JYOTHI *et al.*, 2022).

### **2.6.8 Técnicas de preparo**

O preparo dos filmes tópicos pode ser realizado por meio de dois métodos: evaporação do solvente, em que se obtém filmes com tamanhos determinados antes da aplicação na pele e as soluções poliméricas em *spray*, sendo administradas no estado líquido, com formação do filme diretamente na pele (LABELLA-LORITE *et al.*, 2020).

O método de evaporação do solvente consiste em moldar uma solução aquosa polimérica em uma superfície plana, que após a secagem do solvente, ocorre a formação de filmes finos, sendo facilmente retirados dessa superfície (FERREIRA *et al.*, 2017).

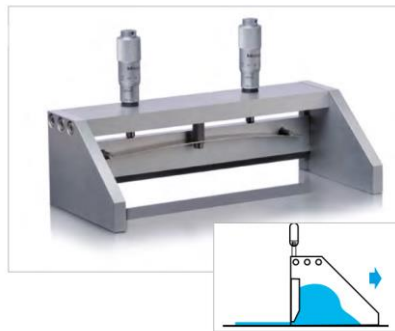
Para realizar a moldagem dos filmes poliméricos pode-se utilizar um dispositivo tecnológico denominado laminador (FagronLab – patente MU91025486). Esse equipamento possui 4 letras A, B, C e D, as quais permitem o preparo de filmes em 4 espessuras diferentes (Figura 7.). O propósito dessa invenção consiste na criação de monodoses de medicamentos tópicos, em tamanhos e espessuras pré-determinadas, obtendo-se conformidade de peso médio e uniformidade de conteúdo (RAPOSO *et al.*, 2017).

Figura 7 - Laminador farmacêutico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

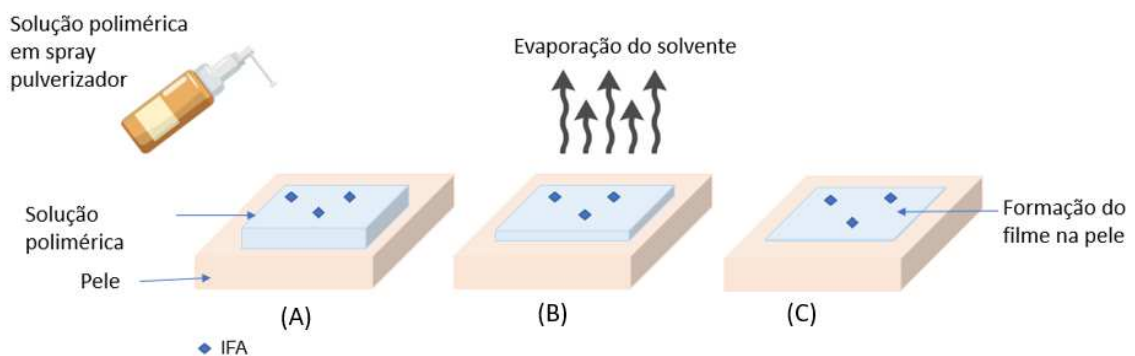
Existe um outro tipo de dispositivo que pode ser utilizado no preparo de filmes poliméricos com a mesma técnica empregada no laminador, o equipamento *Film Casting Knife* (BYK Gardner, Silverspring, MD, USA; gap 450  $\mu\text{m}$ ). Diferente do dispositivo anterior, não possui letras que alteram a espessura dos filmes, sendo o ajuste realizado no momento da laminação (Figura 8). Esse dispositivo foi utilizado por Padula *et al.* (2019) no preparo de filmes tópicos contendo propranolol.

Figura 8 - *Film Casting Knife*.

Fonte: Manual BYK-GARDNER (2019).

O método de soluções poliméricas em *spray* é considerado mais simples do que a laminação, visto que o processo de formação do filme é no momento da aplicação na pele, logo após a evaporação do solvente (KATHE; KATHPALIA, 2017). A preparação pode ser aplicada independentemente da forma e da área, como foi visto na técnica de evaporação do solvente. Porém, para que essa aplicação ocorra de forma uniforme, a solução polimérica precisa estar em um recipiente de *spray* calibrado.

Dessa maneira, alguns fatores precisam ser levados em consideração para que a formulação possua uma aplicação padronizada, como: viscosidade, padrão de pulverização, ângulo de pulverização, distribuição das gotas de pulverização na pele e tempo de secagem (RANADE *et al.*, 2017). O esquema de formação de filme *in situ* é demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema de formação de filmes tópicos poliméricos *in situ*.

Legenda: (A) Solução polimérica em *spray* contendo substâncias ativas, pulverizada sob a pele; (B) Evaporação do solvente da solução polimérica; (C) Formação do filme polimérico na pele após a evaporação.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Em relação ao esquema acima, a diferença de administração entre as técnicas de preparo laminação e solução polimérica ocorre pelo fato de o filme laminado estar no estado seco e possuir propriedades adesivas somente quando a pele estiver umedecida com uma pequena quantidade de água (PADULA *et al.*, 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações tópicas contendo EST e  $\beta$ -SIT e realizar a avaliação da sua penetração cutânea.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter o extrato e a PHEX de *P. aculeata*;
2. Avaliar a citotoxicidade da PHEX das folhas de *P. aculeata* e dos metabólitos isolados principais presentes na partição, EST e  $\beta$ -SIT, em células de fibroblastos L929;
3. Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* da partição hexânica das folhas de *P. aculeata*, e dos metabólitos isolados, EST e  $\beta$ -SIT, por meio de porcentagem de inibição de óxido nítrico;
4. Avaliar a toxicidade aguda da PHEX e dos compostos isolados por método alternativo à experimentação animal, *in vivo* em larvas de *Z. morio*;
5. Desenvolver formas farmacêuticas tópicas, gel creme e filme tópico, para incorporação do EST e do  $\beta$ -SIT;
6. Desenvolver e validar um método analítico para quantificação dos fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT na pele, por CLAE-UV-DAD;
7. Avaliar a penetração cutânea dos fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT a partir das formas farmacêuticas desenvolvidas.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

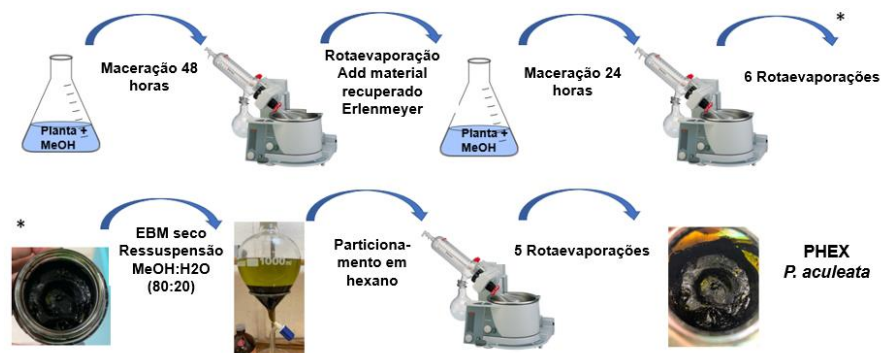
Folhas de *P. aculeata* Miller foram coletadas em Juiz de Fora no período de janeiro a abril de 2022, na parte da manhã. Uma parte do material foi depositado no herbário Leopoldo Krieger CESJF da UFJF sob o número 57539.

#### 4.1.2 Preparo do extrato bruto e partição hexânica

O EB e a PHEX foram preparados de acordo com a metodologia desenvolvida por Pinto *et al.* (2015a). As folhas foram secas em estufa de circulação e renovação de ar (modelo SL102, marca Solab), durante 5 dias. Logo após, aproximadamente 675 g do material foram moídos em moinho de facas (SL30, SOLAB®), peneirado em malha 20 *mesh* (0,85 mm) e submetidos à maceração em metanol (Êxodo científica), durante 48 horas. Em seguida, foram realizadas a filtração e a rotaevaporação para concentrar a amostra, obtendo assim o EBM.

Para o preparo da PHEX, 46,94 g do EBM foram ressuspensos em metanol:água (8:2), e particionados com hexano (Êxodo científica). Ao todo foram feitos 5 particionamentos até o hexano ficar límpido, indicativo de completa extração dos metabólitos apolares (Figura 10). A PHEX foi armazenada hermeticamente fechada sob refrigeração a 4° C, para posteriores testes.

Figura 10 - Fluxograma da obtenção da amostra pela extração e particionamento.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

## 4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

### 4.2.1 Cultura celular

Foram utilizadas células de fibroblastos murinos L929 (ATCC® CCL-1 NCTC), cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementadas com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF - Cultilab) e 1% da solução dos antibióticos Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Nova Biotecnologia), em garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> (Nest) e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic, MCO-18ACL-PA, EUA), até atingirem 80% de confluência. Logo após, o meio foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS-Sigma-Aldrich), e adicionou-se 1 mL de solução de tripsina/EDTA 0,25% nas garrafas de cultura, as quais foram incubadas por 24 horas à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Logo após, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% da solução de antibióticos para a inativação da enzima. Em seguida, o meio contendo as células foi recolhido e transferido para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL (Kasvi), e centrifugado à 3500 rpm por 4 minutos (K14-4000, Kasvi). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% de solução de antibióticos. As suspensões de células foram diluídas diretamente no corante Azul de *Trypan* (Dinâmica Química, Indaiatuba, Brasil) para a contagem em câmara de *Neubauer* para dar prosseguimento ao ensaio de viabilidade celular.

#### 4.2.1.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida por Mosmann *et al.* (1983). Culturas de células com alta confluência foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5 x 10<sup>3</sup> células/poço e incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi removido e adicionou-se 100 µL de meio DMEM suplementado (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) contendo a PHEX de *P. aculeata* nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL, obtidas por diluição seriada e em

quadruplicata. A PHEX foi previamente diluída em 20 µL de DMSO (Êxodo Científica). Para os ensaios com as substâncias puras, o EST e o β-SIT foram avaliados nas concentrações de 3,125 a 50 µg/mL, obtidas por diluição seriada e em quadruplicata. As substâncias foram previamente diluídas em 20 µL de etanol absoluto (Dinâmica). Como controles, foram utilizados meio DMEM (controle negativo), meio DMEM acrescido do solvente (solução de DMSO a 0,4% (v/v)), meio DMEM acrescido do solvente (solução de EtOH a 0,4% (v/v)) e solução de DMSO 5% (v/v) (controle positivo). A placa foi incubada por 24 horas à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 90 µL de meio DMEM suplementado acrescido de 10 µL de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio) (MTT – Inlab) à 5 mg/mL. A placa foi incubada por duas horas e meia à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação do precipitado de formazan pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis, foi realizada a dissolução em 100 µL de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (*Epoch Microplate Spectrophotometer*, Agilent Bio Tek, Gen5 versão 3.08, EUA) a 595 nm.

O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade. A comparação entre as médias dos valores de viabilidade celular em porcentagem foi realizada empregando-se o Teste ANOVA *Way* e *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de  $p < 0,05$ .

#### **4.2.2 Ensaio de inibição do radical de óxido nítrico**

A inibição do radical NO foi realizada *in vitro*, por meio de detecção em modo indireto, com a conversão do NO em nitrito. A reação ocorre por ação do oxigênio, sendo conhecidamente descrita como reação de *Griess*.

Para induzir a produção de NO, é utilizado o tampão nitroprussiato de sódio (NPS) (10 mM) em tampão fosfato (TF) (10 mM, pH 7,4). Como controles positivos, foram utilizados o Trolox (*Sigma-Aldrich*), quercetina (*Sigma-Aldrich*) e ácido gálico (Êxodo científica), solubilizados em DMSO:tampão fosfato (1:9) e testadas nas concentrações, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, obtidas por diluição seriada e em triplicata. A PHEX da *P. aculeata*, o EST e o β-SIT, foram preparados nas mesmas

condições que os controles positivos. Logo após, foram adicionados 62,5 µL de nitroprussiato de sódio (NEON) e 62,5 µL de controle/amostra na placa de 96 poços. O branco da amostra foi preparado, o NPS foi substituído por tampão, e o controle negativo onde a amostra foi substituída por DMSO:tampão. A placa foi submetida à luz e temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, 125 µL do reagente de Griess foi adicionado, procedendo-se à leitura no espectrofotômetro (*Epoch Microplate Spectrophotometer*, Agilent Bio Tek, Gen5 versão 3.08, EUA) após 10 minutos, a 540 nm. Foi utilizado para análise estatística a análise de variância ANOVA *two-way* e comparados pelo teste de *Bonferroni*. Os resultados como média ± desvio padrão e os cálculos foram realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de  $p < 0,05$ .

A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo de porcentagem de inibição (Equação 1 e 2):

$$A_{am} = Abs amostra - Abs branco \quad \text{Equação (1)}$$

$$\%I = 100 - (A_{am} \times 100 / \text{controle negativo}) \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

$A_{am}$  = absorbância da amostra

$\%I$  = porcentagem de inibição

### 4.3 ESTUDO *IN VIVO*

#### 4.3.1 Ensaio de toxicidade aguda em larvas de *Zophobas morio*

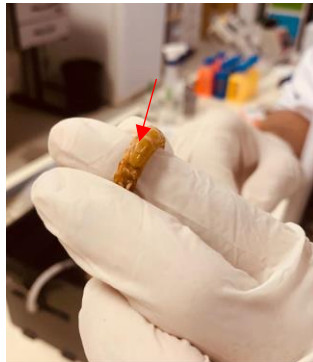
Os ensaios de toxicidade *in vivo* utilizando larvas de *Z. morio* foram realizados em parceria com a Universidade Federal da Bahia (UFBA), no laboratório de Farmacocinética e Farmacométrie, sob supervisão da Prof. Dra. Izabel Alves. A metodologia aplicada no ensaio foi realizada de acordo Brai *et al.* (2023), com adaptações. Para fins de avaliação da toxicidade do EST,  $\beta$ -SIT e PHEX de *P. aculeata*, grupos de larvas de *Z. morio* (n=10) foram separados em placas de *petri*, identificadas e agrupadas (Tabela 2). Foi determinado o peso médio das larvas de cada grupo, as soluções das amostras foram preparadas de acordo com as

concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade em células de L929 de fibroblastos.

As concentrações testadas de EST e  $\beta$ -SIT foram 12,5, 25, 50, 150 e 250 mg/kg e as concentrações avaliadas da PHEX foram 50, 100, 250, 750 e 1000 mg/kg. A escala *log* foi aplicada para a determinação da dose letal dos compostos. Como controle negativo foi utilizado o tampão salino e como controle positivo, 100% de DMSO (Dinâmica). Também foram preparados controles dos solventes usados na solubilização dos compostos.

Após o preparo das soluções, foram injetados 10  $\mu$ L na terceira vértebra na posição ventral de cada larva (Figura 11), com o auxílio de uma microseringa de *Hamilton* de 10  $\mu$ L e a sobrevivência foi registrada a cada 24 horas durante 5 dias. As larvas foram acondicionadas com alimento *ad libitum* e algodão umedecido com água; a reposição da comida e da água eram realizadas todos os dias ao final do registro da taxa de sobrevivência (Figuras 12).

Figura 11 - Terceira vértebra posição ventral de larvas *Zophobas morio*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 12 - Larvas acondicionadas com comida e água *ad libitum*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Ao final dos 5 dias de experimento, os gráficos de curva dose-resposta foram plotados através do programa *GraphPad Prism*. As concentrações foram transformadas para valores em logaritmo ( $X = \text{Log}(x)$ ) e o cálculo da  $DL_{50}$  foi determinado.

Tabela 2 - Grupos experimentais de *Zophobas morio*.

Grupos experimentais (n=10)	Etanol 20 µL	DMSO 20 µL	Tampão salina	DMSO 100%	Estig-masterol	β-sitosterol	<i>P. aculeata</i>
Controle positivo	-	-	-	+	-	-	-
Controle negativo	-	-	+	-	-	-	-
Controle solvente	+	+	-	-	-	-	-
12,5 mg/kg	-	-	-	-	+	+	-
25 mg/kg	-	-	-	-	+	+	-
50 mg/kg	-	-	-	-	-	-	+
100 mg/kg	-	-	-	-	-	-	+
150 mg/kg	-	-	-	-	+	+	-
250 mg/kg	-	-	-	-	+	+	+
750 mg/kg	-	-	-	-	-	-	+
1000 mg/kg	-	-	-	-	-	-	+

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

##### 4.4.1 Determinação da solubilidade da PHEX, estigmasterol e beta-sitosterol

Para iniciar o desenvolvimento das formulações tópicas, o primeiro passo foi a avaliação da solubilidade da PHEX, EST e β-SIT seguindo a tabela de solubilidade da Farmacopeia Brasileira (2019) (Tabela 3). Os solventes utilizados foram água, etanol (Dinâmica), polietilenoglicol 400 (Neon), polisorbato 80 (Êxodo Científica), propanediol (Engenharia das Essências), glicerina (LabSynth) e DMSO (Dinâmica).

Tabela 3 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados

Termo descritivo	Volumes aproximados em mililitros por grama de substância
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019).

#### **4.4.2 Determinação das propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol**

A predição das propriedades físico-químicas foi realizada através da ferramenta *SwissADME*, servidor online (<http://www.swissadme.ch/>), de acordo com a metodologia realizada por Bakchi *et al.* (2022). As estruturas moleculares do EST e  $\beta$ -SIT foram exportadas do *Clarivate* em formato mol, e as propriedades físico-químicas, peso molecular (PM), coeficiente de partição (log P), número de ligações de hidrogênio (ligação H) e o coeficiente de permeabilidade (*log Kp*) foram avaliadas.

#### **4.4.3 Procedimento de preparo das formas farmacêuticas**

As formulações foram desenvolvidas no Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano), na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Diversos experimentos foram realizados e no final foram desenvolvidos 2 tipos de formulações, gel creme e filme tópico.

##### *4.4.3.1 Procedimento de preparo gel-creme*

A formulação do gel-creme foi realizada sem aquecimento. Para isso, primeiramente foi feito a trituração do mentol (Fagron), do BHT (Fagron) e do Dry-flo® (PharmaSpecial). Logo após, foi realizada a levigação com o propanediol, e adicionado os outros componentes da formulação, o Optiphen® (Fagron), o silicone DC200/350 (Florien) e o Hostacerin® SAF (fornecedor). A água purificada foi adicionada aos poucos sob constante agitação para a formação do gel-creme. Foi verificado o pH e realizado o ajuste na faixa de 4,5 – 5,0, com solução de ácido cítrico 20% ao final. As formulações testadas do gel-creme, bem como a composição qualitativa da formulação escolhida para penetração cutânea, encontram-se nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4 - Composição das formulações testadas de gel-creme

Componentes	F1	F2	F3	F4*
(%, p/p)				
Hostacerin® SAF	8	8	4	6
Glicerina	2	5	-	-
Propanediol	-	-	2	5
Dry-Flo	3	-	-	-
Silicone DC 200/350	-	2	1	2
Optiphen®	1	1	1	1
Mentol	0,5	0,3	-	0,2
BHT	-	-	0,05	0,05
Água purificada, qsp	100	100	100	100

\*Formulação de escolha para os estudos de penetração.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 5 - Composição qualitativa gel-creme F4.

Componentes	INCI NAME	Funções
Hostacerin® SAF	<i>Mineral Oil (and) Isopropyl Palmitate (and) Trilaureth-4 Phosphate (and) Rapeseed Oil Sorbitol Esters (and) Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer.</i>	Agente doador de viscosidade, base auto emulsionante
Zemea®	<i>Propanediol</i>	Umectante e emoliente
Silicone DC 200/350	<i>Dimethicone</i>	Modificador de sensorial e emoliente
Dry-Flo®	<i>Aluminum starch octenyl succinate</i>	Agente modificador de sensorial com efeito mate
Optiphen®	<i>Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol.</i>	Conservante
Mentol	<i>Menthol</i>	Promotor de penetração
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	Antioxidante
Água purificada	<i>Aqua</i>	Veículo

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).



#### 4.4.3.2 Procedimento de preparo filme tópico

Para o preparo do filme tópico, foi utilizado o laminador farmacêutico (Figura 13), seguindo o método adotado para o preparo dos filmes por evaporação de solvente, descrito por Ferreira *et al.* (2017), que consiste em moldar uma solução aquosa polimérica em uma superfície plana (placa de vidro), sendo que após a secagem do solvente, ocorre a formação do filme, que é facilmente retirado dessa superfície.

Figura 13 - Dispositivo para laminação dos filmes tópicos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O preparo da base do filme tópico foi realizado da seguinte forma: primeiramente foi feita a dispersão do pullulan (Attivos Magistrais) em água purificada, em seguida adicionado o PEG 400, o propanediol, a imidazolidinil ureia (Chemyunion) e o mentol. A combinação de polímeros testadas, bem como composição qualitativa da formulação escolhida para o ensaio de penetração cutânea encontram-se nas Tabela 6 e 7. Foi verificado o pH após a solubilização dos componentes. Para laminação, foi utilizada a letra C do laminador farmacêutico sobre a superfície de uma placa de vidro, adicionada a base do filme tópico e movido o laminador pelo cabo até o final da extremidade da placa. A secagem dos filmes foi realizada na estufa a 40 – 45 °C durante 50 minutos (Fanem, 315 SE-Primo). Após, retirou-se a placa da estufa, e realizou-se o corte dos filmes no tamanho 6x5 cm e realizado a determinação do peso médio. O esquema de preparo dos filmes tópicos pode ser observado na Figura 14.

Tabela 6 - Composição das formulações testadas do filme tópico.

Componentes (%, p/p)	F1	F2	F3	F4	F5	F6*
Pullulan	-	-	-	10	12	<b>14</b>
PVA	5	7	7	-	-	-
HPMC	2	-	2	-	-	-
PEG 400	-	4	2	4	2	<b>2</b>
Glicerina	5	-	-	5	-	-
Propanediol	2	2	2	2	2	<b>2</b>
T80	2	2	2	2	2	<b>2</b>
Germall™ 115	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	<b>0,3</b>
Mentol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	<b>0,2</b>
Água purificada, qsp	31,50	34,50	34,50	26,50	31,50	<b>29,50</b>

\***Formulação de escolha para os estudos de penetração.**

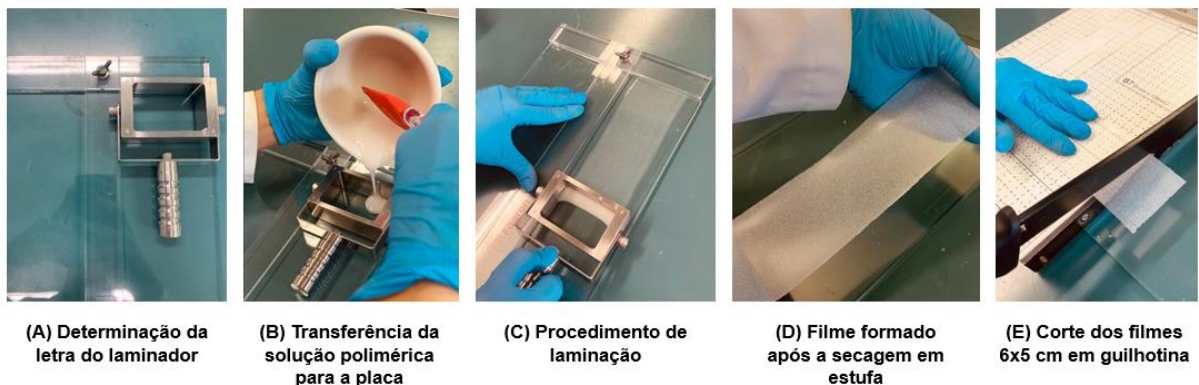
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 7 - Composição qualitativa filme tópico F6.

Componentes	INCI NAME	Funções
Pullulan	<i>Pullulan</i>	Agente filmógeno, doador de viscosidade
PEG 400	<i>Polyethylene Glycol</i>	Agente plastificante
Zemea®	<i>Propanediol</i>	Umectante e emoliente
Mentol	<i>Menthol</i>	Promotor de penetração
Tween® 80	<i>Polysorbate</i>	Emulsificante e plastificante
Germall® 115	<i>Imidazolidinyl Urea</i>	Conservante
Água purificada	<i>Aqua</i>	Veículo

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 14 - Esquema de preparo de filmes tópicos pelo método de evaporação por solvente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.4.3.2.1 Determinação do peso médio dos filmes

Para realizar o peso médio dos filmes, foi determinada a pesagem de 10 filmes tópicos em balança eletrônica de precisão (AUY220, Shimadzu), e determinado a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

#### 4.4.3.2.2 Determinação do fator de correção (FC)

Foi realizado o cálculo de fator de correção para determinar a quantidade de veículo utilizada para o preparo dos filmes. Dessa forma, foi somado a quantidade de ingredientes não evaporáveis que compõem 100 g da base do filme tópico (Equação 3).

$$FC = \frac{100}{Teor} \quad \text{Equação (3)}$$

No qual o teor, é a soma dos ingredientes não evaporáveis das formulações.

## 4.5 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESTIGMASTEROL BETA-SITOSTEROL EM FORMULAÇÕES E NA PELE

O método analítico foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Delgado-Zamarreno *et al.* (2016), com algumas adaptações. O doseamento dos fitoesteróis foi realizado por CLAE-UV-DAD (*Waters* E2695, detector UV-Vis PDA2998). Foi utilizada uma coluna de fase reversa Eclipse Plus C18 (4,6 x100 mm; 5 µm; Agilent) e fase móvel composta por uma mistura de metanol e água (98:02 v/v). O fluxo da fase móvel foi 0,9 mL/min, o volume da injeção das amostras foi de 50 µL; a temperatura do forno 25°C e a detecção foi realizada a 210 nm. Os espectros completos foram registrados na faixa de 210–400 nm. O sistema foi controlado pelo software da *Waters* que também realizou a coleta de dados do DAD e medidas quantitativas. O tempo de corrida de cada amostra foi de 15 minutos.

### 4.5.1 Validação do método analítico

O método foi validado de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação, seguindo os critérios da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

#### 4.5.1.1 Seletividade

A seletividade foi determinada qualitativamente por meio da sobreposição de cromatogramas com os possíveis interferentes que podem estar presentes nas amostras no mesmo tempo de retenção, como por exemplo, diluentes e componentes da matriz. Foi realizado o comparativo da matriz, que consiste no branco da pele, o branco das formulações do filme tópico e do gel-creme e os padrões das amostras de EST e β-SIT.

#### 4.5.1.2 Linearidade

A curva analítica foi construída a partir da solução estoque de EST e  $\beta$ -SIT em metanol, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . A partir da solução estoque em metanol, foram realizadas 6 diluições seriadas, obtendo-se as seguintes concentrações: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A análise em CLAE-UV-DAD foi realizada em triplicata e as curvas analíticas foram plotadas de acordo com a relação entre a concentração e a área do pico fornecida pelo equipamento após a injeção das amostras padrão.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de regressão linear, obtendo-se uma reta no formato  $y = ax + b$ , em que (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), considerando aceitável o valor de r superior à 0,99. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software Microsoft Excel®.

#### 4.5.1.3 Precisão e exatidão

Foram realizadas dezoito determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, sendo elas, três concentrações: baixa, média e alta (10; 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$ ) com seis replicatas em cada nível. Para a medida da repetibilidade foram considerados resultados obtidos em uma rodada de experimento e para precisão intermediária os resultados obtidos em rodadas diferentes.

A precisão pode ser expressa numericamente através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). As equações utilizadas para o cálculo do DPR estão descritas a seguir.

$$S = \frac{\sum(\sqrt{x_i - x_m})^2}{n-1} \quad \text{Equação (4)}$$

$$DPR(\%) \text{ OU } CV(\%) = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo:

$x_m$ : média das determinações

$x_i$ : valor individual de uma medição

n: número de medições.

#### 4.5.1.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção foi definido pela obtenção da menor quantidade de analito presente em uma amostra que poderia ser detectado, mas não quantificado, nas condições experimentais estabelecidas. O cálculo foi realizado a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas contendo as concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção. Para o estabelecimento do valor, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$LD = \frac{3,3x\sigma}{IC} \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo:

$\sigma$ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva

O limite de quantificação foi definido pela menor quantidade de analito na amostra que obteve precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais estabelecidas. O cálculo foi obtido a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de 3 curvas analíticas com as concentrações do analito próximas ao limite de detecção. A seguinte equação foi adotada para o cálculo:

$$LQ = \frac{10x\sigma}{IC} \quad \text{Equação (7)}$$

Sendo:

$\sigma$ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva

#### 4.5.1.5 Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado utilizando pele de orelha de porco, obtida por um matadouro local (Fripai Alimentos, Juiz de Fora – MG). Logo após o abate, as

orelhas foram encaminhadas para o laboratório de Controle de qualidade e realizado o procedimento de limpeza com água destilada. Em seguida a pele foi removida da cartilagem com auxílio de um bisturi. Da pele foram retirados os pêlos, os vasos sanguíneos e o tecido adiposo, restando apenas o estrato córneo, epiderme e derme. As peles limpas foram armazenadas sob refrigeração a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , podendo ser utilizada por no máximo 30 dias.

Para fins de realização do ensaio de recuperação, as peles foram cortadas em áreas de  $1,77\text{ cm}^2$  (área do compartimento doador da célula de *Franz*), com o auxílio de uma tesoura. As peles fragmentadas foram colocadas em um isopor recoberto por papel alumínio e em seguida foram adicionadas soluções padrão de EST nas concentrações de (2, 3 e 4%) e  $\beta$ -SIT nas concentrações de (2,5, 4 e 5%). As porcentagens da recuperação abrangem a curva analítica de até  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$  (Tabela 8).

Após a evaporação total do metanol, as peles foram picotadas em um vidro relógio e passadas para um tubo falcon de 10 mL no qual foram adicionados 2,5 mL de metanol. Em seguida, as amostras foram colocadas em ultrassom por 15 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$ , passadas no vórtex por 60 segundos e depois um novo ciclo de 15 minutos no ultrassom. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (CentralBio, TDL 80-2B). O sobrenadante das amostras foi filtrado em membrana com porosidade de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  e quantificado por HPLC. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração analisada.

Tabela 8 - Concentrações das porcentagens de recuperação.

Recuperação (%)	Concentrações Estigmasterol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	Concentrações B-Sitosterol ( $\mu\text{g/mL}$ )
2	56,64	2,5	70,90
3	84,96	4	113,28
4	113,28	5	141,60

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O ensaio de recuperação irá apresentar a relação entre a concentração encontrada na análise e a concentração teórica. O cálculo foi realizado através da seguinte equação:

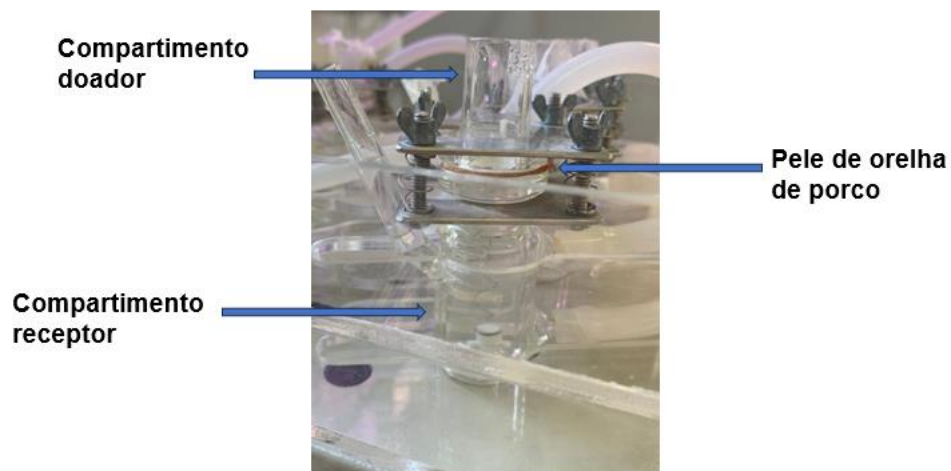
$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação(8)}$$

Em que: A concentração média experimental corresponde a concentração encontrada pelo método validado por HPLC e a concentração teórica corresponde a concentração conhecida adicionada na pele.

#### 4.6 ESTUDO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA *EX VIVO* DO ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Para a realização do estudo foi utilizada pele de orelha de porco conforme relatado no ensaio de recuperação. As células de difusão vertical tipo *Franz* foram montadas (Figura 15). O compartimento doador foi preenchido com 12 mL de meio receptor etanol:água (50:50, v/v), de acordo com as recomendações de meio receptor para substâncias lipofílicas do *Guidance Notes on Dermal Absorption* da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2004). Peles de orelha de porco com área de 1,77 cm<sup>2</sup> foram adicionadas entre o compartimento doador e receptor e em seguida, foi ligado o banho de aquecimento a 37 °C. Foi aguardado 15 minutos para equilíbrio do sistema.

Figura 15 - Célula de difusão do tipo *Franz* montada com a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do receptor.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).



Para a formulação de gel-creme, foram adicionados 59 mg da formulação com EST e  $\beta$ -SIT na concentração de 6% cada, e como controle foram adicionados 59 mg do gel-creme puro, sem os fitoesteróis. Para a formulação de filme tópico, os filmes contendo 6% de  $\beta$ -SIT foram cortados em áreas de 1,77 cm<sup>2</sup>, com o auxílio de um bisturi (Figura 16), que corresponde à mesma dosagem do gel-creme, e adicionados no compartimento doador, com a pele de orelha de porco previamente umedecida com água purificada. A solução receptora foi mantida sob agitação constante de 500 rpm.

Figura 16 - Filmes tópicos com beta-sitosterol 6%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Ao final das 24 horas de experimento, as células foram desmontadas e o excesso de formulação na pele foi retirado com o auxílio de uma gaze umedecida com água purificada. As peles foram fixadas com o auxílio de uma fita adesiva em um suporte de isopor com papel alumínio, a fim de deixar exposto somente a área que permaneceu em contato com a formulação e o estrato córneo foi removido pela técnica denominada *tape stripping*, com a aplicação de uma fita adesiva, por 20 vezes em cada pele, procedimento padronizado para a total remoção do estrato córneo. Logo após as peles foram picotadas e realizado o mesmo processo de extração que o ensaio de recuperação.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados quantitativos estão apresentados nas tabelas e figuras como média  $\pm$  desvio padrão, de no mínimo, 3 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism*. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância ANOVA, seguido de *post-tests* de *Bonferroni* com comparação múltipla dos dados, para os ensaios de inibição do radical de NO e citotoxicidade. Na análise estatística dos ensaios de penetração cutânea foi utilizada o Teste *t* student seguido do teste U de *Mann-Whitney*. O nível de significância estatística para todas as análises foi aceito como  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E PARTIÇÃO HEXÂNICA

O rendimento do EBM e da PHEX de *P. aculeata* foi de 6,95% e 1,98% respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Massa e rendimento do extrato bruto metanólico e partição hexânica de *Pereskia aculeata*.

Amostra (Extrato/partição)	Massa (g)	Rendimento (%)
EBM	46,94	6,95
PHEX	13,39	1,98

Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição hexânica.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

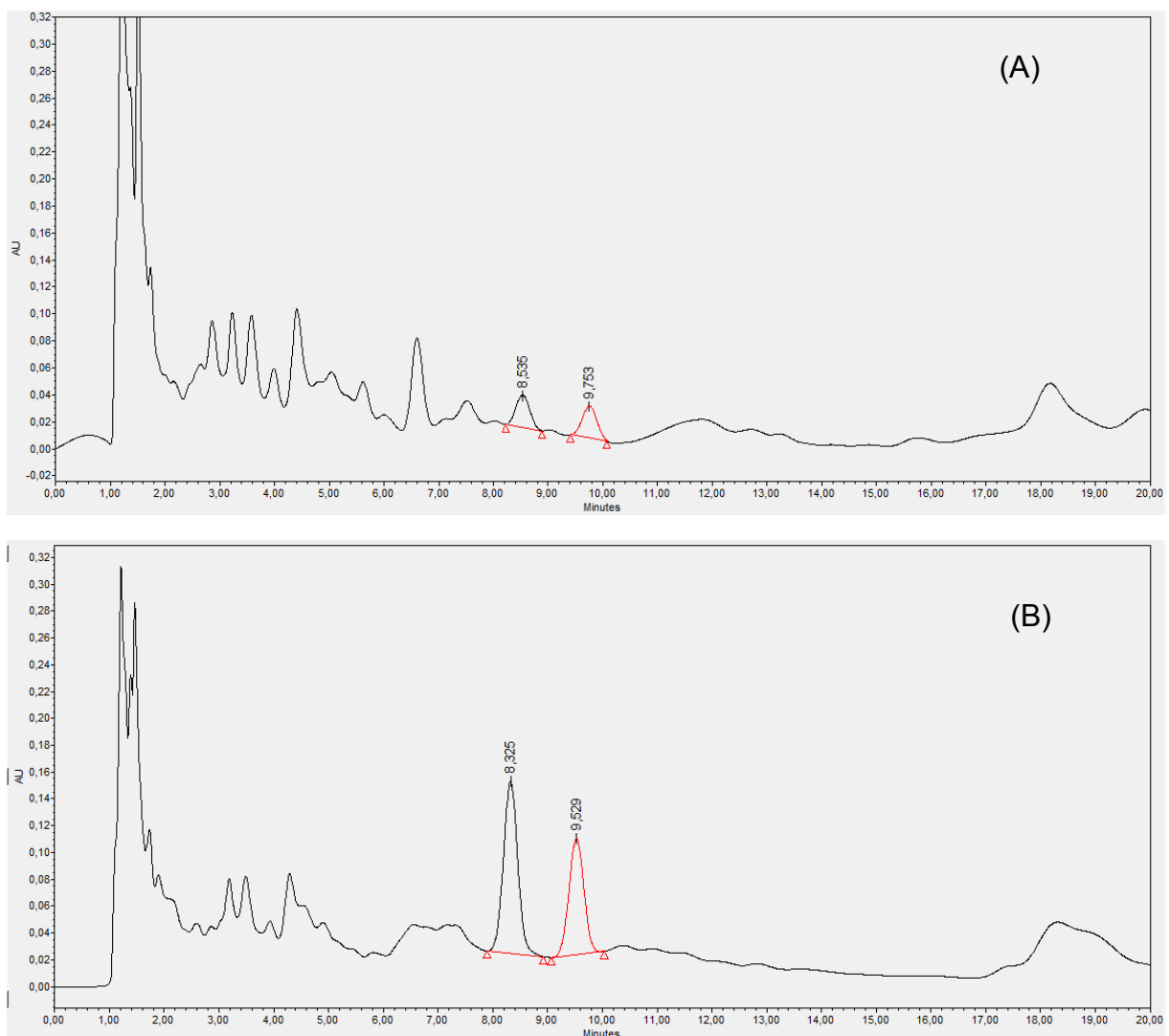
Observando o rendimento do EBM e da PHEX e comparando com os resultados obtidos em outros trabalhos, o método de extração utilizado foi adequado para a preparação do extrato e da partição. Pinto *et al.* (2015a), obtiveram rendimentos do EBM de 14% e PHEX de 27%.

Outras formas de extração foram pesquisadas na literatura com o intuito de realizar uma extração verde, sem a utilização de solventes orgânicos. Uma das técnicas pesquisadas foi a extração por fluido supercrítico (EFS), uma excelente opção para extração de compostos apolares, em que geralmente é utilizado o dióxido de carbono como solvente extrator (SHARIF *et al.*, 2015). Porém, esta técnica possui algumas limitações como o alto custo e o baixo rendimento. Dados na literatura demonstram que o rendimento da extração de *P. aculeata* por EFS, são de 1,8% (TORRES *et al.*, 2022).

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL NA PARTIÇÃO HEXÂNICA DE PERESKIA ACULEATA

Foi realizado a quantificação dos fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT, presentes na PHEX de *P. aculeata*. O ensaio foi realizado por CLAE-UV-DAD. Primeiramente foram realizadas injeções da curva analítica dos padrões de EST e  $\beta$ -SIT, nas concentrações de 3,125 – 200  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, foi injetada a solução metanólica de 1000  $\mu\text{g/mL}$  da PHEX de *P. aculeata* e a corrida teve duração de 30 minutos (Figura 17 (A)). Para fins de confirmação do EST e  $\beta$ -SIT, foi realizada a fortificação da amostra com 200  $\mu\text{g/mL}$  dos padrões (Figura 17 (B)).

Figura 17 - Cromatogramas da partição hexânica obtido por meio de CLAE-UV-DAD.



Legenda: (A) Cromatograma PHEX 1000 µg/mL. (B) Cromatograma PHEX 1000 µg/mL, fortificado com os padrões de EST e β-SIT. Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através da análise dos cromatogramas, o EST e β-SIT apresentaram tempos de retenção de 8,525 e 9,750 minutos, respectivamente, para a amostra de PHEX de 1000 µg/mL. Já a amostra fortificada com os padrões, os tempos de retenção do EST e β-SIT foram 8,325 e 9,529 minutos, respectivamente.

Os valores do teor do EST e β-SIT estão apresentados na tabela 8. A equação da reta obtida para a dosagem do teor de EST e β-SIT foi obtida por meio da regressão linear. Os dados da curva foram  $y = 15141x + 52725$  com coeficiente de determinação de  $R^2 = 0,9977$  e  $y = 11229x + 38838$  com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9976$ , respectivamente.

Tabela 10 - Teor de estigmasterol e beta-sitosterol na partição hexânica de *Pereskia aculeata*.

Amostras	Concentração (µg/mL)	Teor (%)
EST	23,59 ± 0,55	2,359
β-SIT	39,16 ± 0,78	3,916

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Com relação à concentração das amostras, é possível observar que o teor de EST e β-SIT encontrados na PHEX de *P. aculeata* estão abaixo dos valores encontrados na literatura. Pinto *et al.* (2015a) analisou a PHEX por CG-MS e foi sugerido a presença do EST (6,89%) e β-SIT (24,66%), como os principais fitoesteróis presentes na PHEX de *P. aculeata*. Outro estudo realizado por Torres *et al.* (2022), realizou o comparativo de diferentes tipos de extrações das folhas de *P. aculeata* através da análise por *Gas chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry* (GC-q-TOF-MS). Foram identificados 11 compostos, sendo o β-SIT majoritário entre eles. Em relação ao comparativo de extração, o EFS a 60°C apresentou maiores concentrações de β-SIT, quando comparados com a extração por *Soxhlet* usando hexano,  $6,98 \times 10^6$  e  $25,85 \times 10^6$ , respectivamente.

Devido aos fatos apresentados, alguns fatores de influência podem ter contribuído na diminuição da concentração dos metabólitos secundários da PHEX da

*P. aculeata*, como a sazonalidade, o ritmo circadiano e o desenvolvimento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A época da coleta é um dos fatores mais importantes, devido à inconstância do conteúdo dos metabólitos secundários no decorrer do ano. A bioatividade molecular depende de flutuações ambientais diárias e sazonais de temperatura, luz, umidade e precipitação e estão interligadas ao ciclo circadiano endógeno da planta (LIEBELT; JORDAN; DOHERTY, 2019).

A coleta das folhas de *P. aculeata* foram realizadas no período da manhã, entre janeiro e abril. Pinto *et al.* (2015a) também realizou a coleta no período da manhã, porém o material vegetal foi coletado em agosto. Como a amostra foi coletada em estações do ano diferentes, o ciclo circadiano e a sazonalidade podem ter interferido nas concentrações do EST e  $\beta$ -SIT nas folhas da espécie.

Devido à baixa concentração desses metabólitos, os ensaios de penetração cutânea foram realizados com os compostos puros de EST e  $\beta$ -SIT, e os demais ensaios foram realizados com os três compostos PHEX, EST e  $\beta$ -SIT.

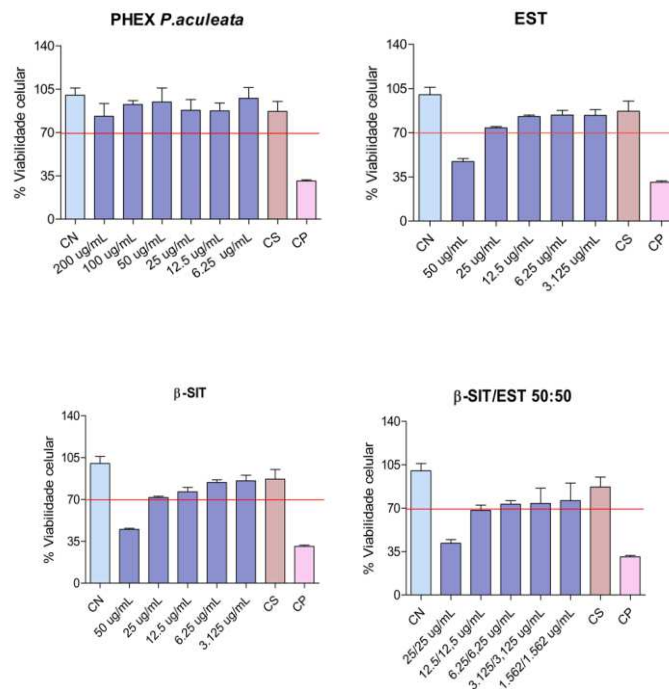
### 5.3 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 5.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade da PHEX das folhas de *P. aculeata*, EST e  $\beta$ -SIT foi realizada a viabilidade celular por MTT. A reação de redução do MTT é catalisada pela desidrogenase mitocondrial e ocorre somente nas células viáveis. São identificados por espectrofotômetro cristais de formazam de cor roxo-azulada intensa, insolúvel em água. O valor de absorvância a ser analisado é diretamente proporcional ao número de células viáveis (NEPOMUCENO *et al.*, 2021).

As linhagens de células de fibroblastos foram tratadas nas concentrações de 200 a 6,25  $\mu\text{g/mL}$  da PHEX de *P. aculeata*. Para os fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT as concentrações foram de 50 a 3,125  $\mu\text{g/mL}$ . O tratamento foi realizado por 24 horas e os resultados da citotoxicidade são apresentados na Figura 18, abaixo.

Figura 18 - Viabilidade celular das células L929 da partição hexânica de *Pereskia aculeata* e os compostos puros estigmasterol e beta-sitosterol.



Legenda: Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  desvio padrão das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ). Resultados de análise estatística obtidos pelo ANOVA Way, seguido de ANOVA *Bonferroni*. Legenda: CN: células L929 + DMEM; CP: células L929+ DMEM + DMSO 100%; CS: células L929+ DMEM + DMSO 5%, utilizado para solubilizar a PHEX; CS: células L929+ DMEM + ETOH 5%, utilizado para solubilizar os fitoesteróis.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A PHEX de *P. aculeata* não demonstrou citotoxicidade nas concentrações analisadas, dentro do parâmetro preconizado pela ISO 10993-5 (2009), em que é considerado efeito citotóxico quando há redução da viabilidade celular em mais de 30%. O EST e  $\beta$ -SIT apresentaram redução da viabilidade celular apenas na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , mas não apresentaram toxicidade no restante das concentrações. A viabilidade celular do restante das concentrações do EST e  $\beta$ -SIT foi acima de 70%.

Além disso, seguindo as análises estatísticas, não houve diferença significativa em relação ao controle negativo. Esses dados demonstram que as concentrações de *P. aculeata* e do DMSO não influenciaram na diminuição de células viáveis. Houve diferença significativa das concentrações do EST,  $\beta$ -SIT e o CS comparadas ao controle negativo. Acredita-se que o solvente utilizado para solubilizar o EST e  $\beta$ -SIT possa ter contribuído para a diminuição das células viáveis.

Existem poucos relatos na literatura sobre a toxicidade da *P. aculeata*, EST e  $\beta$ -SIT. Um estudo realizado por Maciel (2019) verificou a citotoxicidade em fibroblastos (L929) e em queratinócitos (HaCat) do EBM e da PHEX da *P. aculeata*, em que concentrações de 100 a 6,25  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram toxicidade. Outro estudo realizado por Chang *et al.* (2023) avaliou a viabilidade celular dos fitoesteróis estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e campesterol, nas concentrações de 1 – 500  $\mu\text{M}$ , e nenhuma das concentrações apresentou citotoxicidade.

### 5.3.2 Avaliação da inibição do radical de óxido nítrico

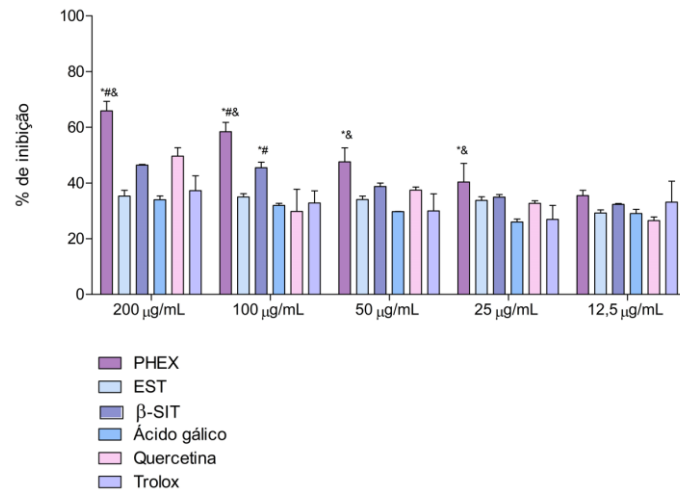
A produção de NO está relacionada a diversos processos do corpo humano, sendo muitas vezes um mediador chave em condições patológicas, como por exemplo, o câncer (VARGAS-MAYA *et al.*, 2021). Em processos inflamatórios, o óxido nítrico pode aparecer em altos níveis, sendo um importante mediador inflamatório, pela Óxido Nítrico Sintetase Induzível (iNOS), do sistema imunológico (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Dessa forma, ativos que inibem a produção de NO podem ter um papel terapêutico importante no tratamento da inflamação e a medição de NO nesses ativos tornou-se um relevante parâmetro para verificação da atividade anti-inflamatória (NGUYEN *et al.*, 2020).

O método de Griess é bastante utilizado para medir as concentrações de NO após a reação em nitrito (SCHMÖLZ *et al.*, 2017). A análise baseia-se na reação de diazotização do nitrito e a sulfanilamida, desencadeando a formação do composto Diazo que possui coloração rósea, em que a intensidade da cor rósea será diretamente proporcional a concentração de nitrito.

Para leitura dos resultados é utilizado o espectrofotômetro UV-vis, (SINGHAPHAN; UNOB, 2021). A intensidade da coloração é demonstrada por meio da placa de 96 poços utilizada no ensaio. Os resultados da porcentagem de inibição do NO das amostras são apresentados na figura abaixo Figura 19.



Figura 19 - Inibição do radical de óxido nítrico da PHEX *Pereskia aculeata*, estigmasterol e beta-sitosterol.



Legenda: Ensaios realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  desvio padrão das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ). ANOVA, seguido pelo teste de *Bonferroni* foram utilizados como teste *post-hoc*. Valores significativos: \*Valores significativamente diferentes para ácido gálico ( $P < 0.05$ ); #Valores significativamente diferentes do quercetina ( $p < 0,05$ ). & Valores significativamente diferentes para Trolox.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Por meio dos dados analisados, as concentrações de 200 – 25  $\mu\text{g/mL}$  da PHEX foram as que apresentaram diferenças significativas em relação aos controles positivos, ácido gálico e Trolox. Somente as concentrações de 200 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de PHEX apresentaram diferenças significativas para a quercetina. A concentração que apresentou a maior porcentagem de inibição e diferença significativa em relação aos controles positivos foi a de 200  $\mu\text{g/mL}$ , com 66% de inibição de NO. Vale a pena ressaltar que embora não tenha ocorrido diferença significativa em todas as concentrações, todas as amostras apresentaram resultados superiores aos dos controles positivos.

Em relação ao EST, não houve diferença significativa entre os controles positivos. Já o  $\beta$ -SIT apresentou diferença significativa em 100  $\mu\text{g/mL}$  em relação à quercetina, com 45,50% de inibição de NO. Através da análise dos dados, a PHEX obteve uma maior inibição de NO quando comparada com o EST e  $\beta$ -SIT isolados, indicando uma possível ação de inibição através de outros fitoesteróis presentes na partição.

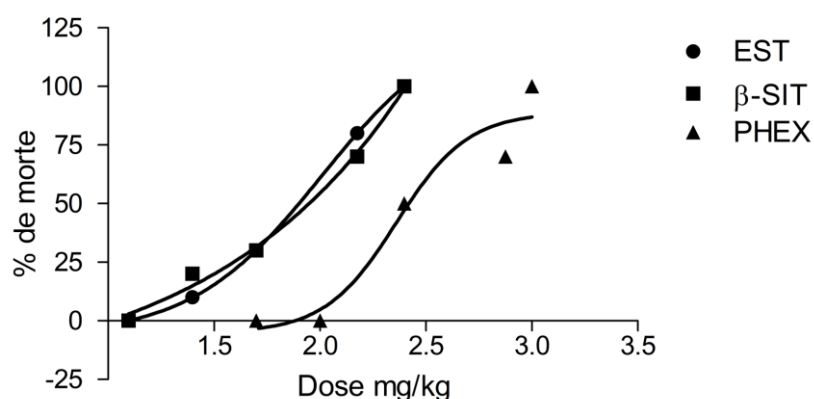
## 5.4 ESTUDO *IN VIVO*

### 5.4.1 Toxicidade *in vivo* em larvas de *Zophobas morio*

Ensaio de toxicidade aguda são fundamentais no processo de desenvolvimento de medicamentos, devido ao fato de apenas compostos que demonstrem segurança nos ensaios pré-clínicos poderão avançar para ensaios clínicos (BRAI *et al.*, 2023). Uma das melhores maneiras de mensurar o grau de toxicidade aguda de substâncias ativas é a determinação da DL<sub>50</sub>. A DL<sub>50</sub> consiste na dose letal capaz de matar 50% dos seres vivos testados (BADIN *et al.*, 2023).

Após os 5 dias de análise, a maior dose que não apresentou letalidade para o EST e  $\beta$ -SIT foi 12,5 mg/kg, em que todas as larvas sobreviveram ao final do experimento. Já a dose que apresentou 100% de letalidade foi 250 mg/kg, nas primeiras 24 horas de experimento. Em relação a PHEX de *P. aculeata* a margem da dosagem foi maior, nenhuma larva morreu ao final do experimento com a aplicação de 100 mg/kg e 100% das larvas morreram com a aplicação da dosagem de 1000 mg/kg, dentro do intervalo de 24 horas de experimento. À partir da relação entre a concentração das doses e a porcentagem de morte das larvas, foram obtida as curvas de dose resposta representadas na Figura 20.

Figura 20 - Curvas doses-resposta da toxicidade de estigmasterol, beta-sitosterol e partição hexânica de *Pereskia aculeata*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após a determinação das curvas dose-resposta, foi realizado o cálculo da DL<sub>50</sub> no *GraphPad Prism*, em que as concentrações foram transformadas em escala log. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados da dose letal 50% do estigmasterol, beta-sitosterol, e partição hexânica de *Pereskia aculeata*.

Compostos	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )
EST	101,5	0,9976
β-SIT	103,8	0,9937
PHEX	229,6	0,9442

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Por meio dos dados obtidos, verificou-se que a PHEX apresentou a maior concentração de DL<sub>50</sub>, resultando em uma menor toxicidade quando comparado com as substâncias puras EST e β-SIT.

Ensaio de toxicidade em modelos alternativos à experimentação já estão elucidados na literatura e são modelos confiáveis na determinação da toxicidade de compostos ativos (DINH *et al.*, 2021). Uma das primeiras larvas estudadas no teste de toxicidade foi a espécie *G. mellonella*, elas possuem sistema imune inato similar ao sistema imunológico dos mamíferos (IGNAZIAK; MAXWELL, 2017). Larvas de *Z. morio* também possuem sistema imune inato similar a dos mamíferos e estão sendo utilizadas recentemente em estudos de toxicidade. Um estudo realizado por De Sousa *et al.* (2023) avaliou a toxicidade do Derivado 2-amino-tiofênico SB-200, com potencial atividade anti-leishmania em larvas de *Z. morio*. Outro estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2023) avaliou a toxicidade da casca de castanha de caju e cardanol, também usando larvas de *Z. morio*.

## 5.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Uma das primeiras etapas dos estudos de pré-formulação é a caracterização das propriedades físico-químicas das substâncias utilizadas e a verificação da

compatibilidade com os excipientes (DERUYVER *et al.*, 2021). Dessa forma, primeiramente foram avaliadas as propriedades físico-químicas do EST e do  $\beta$ -SIT, como a solubilidade, o coeficiente de partição e o peso molecular, fatores que, em geral, podem influenciar na penetração cutânea (KATHE; KATHPALIA, 2017). Logo após, foi realizado o desenvolvimento das formulações, incorporados os fitoesteróis e avaliada a compatibilidade com os excipientes.

### 5.5.1 Avaliação da solubilidade

A solubilidade consiste na maior quantidade que um composto pode dissolver completamente em uma unidade de volume do solvente. A avaliação da solubilidade dos fitoesteróis é um pouco limitada devido à sua estrutura química, pois a presença de um núcleo esteroide policíclico na posição C-17 irá dificultar a solubilidade em água, e um grupamento hidroxila na posição C-3 irá limitar a solubilidade em óleo (MARTINS *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2021). Os resultados de solubilidade da PHEX, EST e  $\beta$ -SIT podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 - Solubilidade da partição hexânica, estigmasterol e beta-sitosterol em diferentes solventes

Componentes (1%)	H2O	EtOH	PEG400	T80	Propanediol	Glicerina	DMSO
PHEX	Insolúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Solúvel
EST	Insolúvel	Solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel
$\beta$ -SIT	Insolúvel	Solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Por meio da análise dos dados, o EST e o  $\beta$ -SIT foram solúveis apenas em etanol absoluto. A solubilidade de fitoesteróis em solventes orgânicos já é conhecida na literatura, apresentando solubilidade em solventes como, hexano, etanol, álcool isopropílico e acetona (LEONG *et al.*, 2011). A PHEX foi solúvel somente em DMSO, devido ao fato de ser um solvente que dissolve compostos polares e apolares e ser miscível em vários solventes orgânicos (HEBLING *et al.*, 2015).

### 5.5.2 Avaliação das propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol

As propriedades físico-químicas foram determinadas por modelagem molecular. A diferença do peso molecular dos fitoesteróis é relativamente baixa, sendo que o  $\beta$ -SIT (414,71 g/mol) apresentou maior peso molecular que o EST (412,69 g/mol). O peso molecular de ambos os fitoesteróis foi menor que 500 g/mol, estando de acordo com a literatura, em que moléculas menores de 500 g/mol atravessam a barreira da pele com menor dificuldade (KATHE; KATHPALIA, 2017). A lipofilicidade foi determinada pelo log P, e os dois fitoesteróis apresentaram valores extremamente altos, sendo que o  $\beta$ -SIT apresentou o maior log P (7,24), não sendo um valor ideal para a entrega tópica relatada na literatura, em que valores de log P ideais variam de 1 a 4 (REYES *et al.*, 2023). Ambos os fitoesteróis apresentaram um acceptor de ligação H e um doador de ligação H. Os números de aceptores e doadores de H podem estar inversamente correlacionados com a penetração na pele, aceptores de  $H \leq 3$  e doadores de  $H \leq 2$ , podem ser considerados como bons penetrantes (TSAKOVSKA *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2023). Além disso, o *software* realizou o cálculo do coeficiente de permeabilidade (*log Kp*), que prevê a penetração cutânea de acordo com as propriedades físico-químicas dos compostos. O  $\beta$ -SIT apresentou maior *log Kp* quando comparado com o EST, indicando maior permeabilidade cutânea (BURLI *et al.*, 2021). Os dados das propriedades físico-químicas estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Propriedades físico-químicas do estigmasterol e beta-sitosterol calculados por meio de modelagem molecular *SwissADME*

Fitoesteróis	Fórmula molecular	PM (g/mol)	<i>log P</i>	Nº H aceptores	Nº H doadores	<i>logK<sub>p</sub></i> (cm/h)
EST	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412,69	6,98	1	1	- 2,74
$\beta$ -SIT	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414,71	7,24	1	1	- 2,20

Legenda: PM, peso molecular; *log P*, coeficiente de partição; *log Kp*, coeficiente de permeabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 5.5.3 Otimização da formulação gel-creme

Formas farmacêuticas em gel-creme podem ser uma boa escolha para o desenvolvimento de formulações tópicas, visto que seus constituintes são absorvidos rapidamente, além da facilidade de incorporação de substâncias (SILVA *et al.*, 2019). O intuito do desenvolvimento da formulação em gel creme contendo EST e  $\beta$ -SIT é obter uma boa espalhabilidade e hidratação do estrato córneo, para a promoção da penetração dos metabólitos de forma eficiente na camada córnea (HOEKSEMA *et al.*, 2013).

Para a formação do gel-creme, foi utilizado o Hostacerin<sup>®</sup> SAF, uma base auto emulsionante preparada em temperatura ambiente que possui doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes em sua composição (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Segundo o informativo técnico do fornecedor *PharmaSpecial*, a base possui uma ampla faixa de pH de estabilidade (4,0 – 9,0), sendo capaz de veicular ativos como hidroquinona e ácido glicólico. A base foi uma boa escolha para incorporar o EST e o  $\beta$ -SIT devido ao fato de não haver dados na literatura suficientes de pH de estabilidade para os compostos.

Foram testadas diferentes concentrações de Hostacerin<sup>®</sup> SAF, bem como de agentes umectantes, modificadores de sensorial, conservantes e antioxidantes. Logo após o preparo das formulações, foram avaliadas as características organolépticas e o pH de cada formulação (Tabela 14). O critério de escolha para o ensaio de penetração cutânea foi baseado nas características organolépticas e aspectos visuais.

Tabela 14 - Avaliação das características organolépticas e pH do gel-creme

Fórmulas	Odor	Homogeneidade	Coloração	Aspectos visuais	pH
F1	Característico mentolado	Homogêneo	Branco	opaco e firme	7,2
F2	Característico mentolado	Homogêneo	Branco	brilhoso e firme	7.5
F3	Característico mentolado	Homogêneo	Branco	Brilhoso e fluido	6.3
<b>F4*</b>	<b>Característico mentolado</b>	<b>Homogêneo</b>	<b>Branco</b>	<b>Brilhoso e consistente</b>	<b>6.7</b>

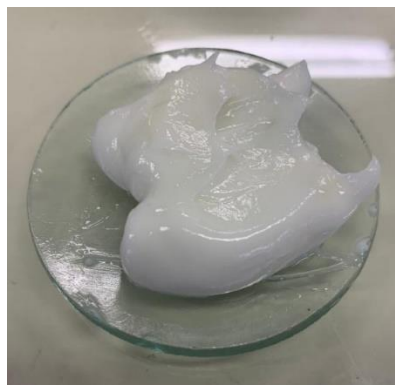
\*Formulação de escolha para os estudos de penetração.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A formulação F4 foi escolhida para a incorporação do EST e  $\beta$ -SIT, por apresentar as melhores características organolépticas e visuais. Na formulação F4, (Figura 21), foi utilizado o propanediol com função umectante para manter a hidratação. O propanediol é um derivado natural extraído do milho, mas também pode ser produzido sinteticamente, amplamente utilizado na indústria farmacêutica como um possível substituto do propilenoglicol (VIVEK *et al.*, 2017). O conservante utilizado na formulação foi o Optiphen<sup>®</sup>, livre de parabenos e de formaldeído, possui fenoxietanol solubilizado em caprilglicol, autorizado no Brasil, União Europeia e no Japão em concentração máxima de 1% (BRASIL, 2012). Como promotor de penetração cutânea, foi utilizado o mentol, um terpeno presente em elevadas concentrações no óleo essencial de hortelã pimenta, utilizado na formulação com o intuito de alterar a barreira do estrato córneo, causando a desestabilização das camadas lipídicas da pele, facilitando a penetração do IFA (MARTINS; VEIGA, 2002). O silicone DC 200/350, foi escolhido para melhorar o aspecto sensorial e a espalhabilidade. Além disso, é sabido que os silicones apresentam função emoliente (GOUSSARD, AUBRY, RATAJ, 2022).

O pH inicial da formulação foi de 6,7, realizado o ajuste para 5,0 com solução de ácido cítrico 20% para deixar mais próximo ao pH da pele. Para a incorporação do EST e  $\beta$ -SIT no gel-creme foi necessário proceder a levigação com propanediol 2%. Os testes foram realizados nas concentrações de 6 e 12% dos fitoesteróis. Porém, a concentração de 12% apresentou dificuldade de incorporação do creme, resultando em uma formulação com aspecto considerado insatisfatório.

Figura 21 - Gel-creme com estigmasterol e beta-sitosterol incorporados na concentração de 6%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

#### 5.5.4 Otimização da formulação filme tópico

A escolha do polímero e do plastificante é a etapa mais importante no desenvolvimento dos filmes poliméricos devido à sua influência na flexibilidade e formação dos filmes. Dessa forma, foram selecionados três tipos de polímeros: pullulan, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e álcool polivinílico (PVA), testados em diferentes concentrações, juntamente com dois tipos de plastificantes, PEG 400 e glicerina.

Foram preparados 50 g de cada solução polimérica e adicionados os componentes restantes da formulação. As soluções poliméricas foram avaliadas em relação à aparência, viscosidade e pH. Logo após, as soluções poliméricas foram laminadas com o auxílio do laminador, cortadas em tamanhos de 6x5 cm e avaliadas em relação ao tempo de secagem, formação do filme, características estruturais e flexibilidade (Tabela 15).

Tabela 15 - Avaliação das características organolépticas dos filmes poliméricos.

Fórmulas	Solução polimérica				Filme polimérico seco		
	Aparência	Viscosidade aparente	pH	Tempo secagem (min)	Formação do filme	Aspecto	Flexibilidade
F1	Turvo	Alta	6,7	50	Completo	Opaco	Quebradiço
F2	Transparente	Alta	7,0	50	Completo	Transparente	Quebradiço
F3	Turvo	Alta	6,9	50	Completo	Opaco	Quebradiço
F4	Transparente	Baixa	4,9	30	Completo	Transparente	Quebradiço
F5	Transparente	Baixa	4,6	30	Completo	Transparente	Média
<b>F6</b>	<b>Transparente</b>	<b>Média</b>	<b>5,1</b>	<b>30</b>	<b>Completo</b>	<b>Transparente</b>	<b>Flexível</b>

**\*Formulação de escolha para os estudos de penetração.**

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Todos os polímeros testados foram capazes de formar filmes, porém fatores como tempo de secagem, aspecto da solução polimérica e flexibilidade foram levados em consideração na escolha da formulação. Por mais que a glicerina tenha um efeito plastificante relatado na literatura, ela não foi capaz de conferir flexibilidade usada de forma isolada. O efeito plastificante só foi observado com a utilização do PEG 400. O PVA e o HPMC não foram os polímeros de escolha devido ao tempo de secagem,



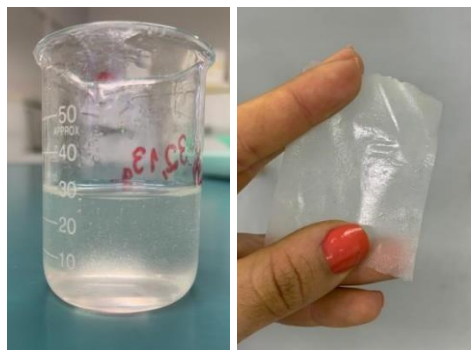
apresentar alta viscosidade da base e o procedimento de preparo relativamente trabalhoso. O PVA é solubilizado em temperaturas mais altas, entre 70 – 80°C, além de demorar em torno de 12 horas para solubilizar, sendo ideal solubilizar *overnight*.

O polímero filmógeno de escolha para os testes de penetração cutânea foi o pullulan, pelo fato de apresentar as melhores características, como: base polimérica translúcida, o tempo de secagem rápido, além do fato dele solubilizar rapidamente em água (em torno de 30 minutos), otimizando o processo de manipulação (WANG *et al.*, 2022). Ademais, o pullulan é biodegradável, atóxico e altamente biocompatível, facilitando a incorporação dos demais excipientes na formulação (THAKUR *et al.*, 2023). A adição do pullulan em formulações pode potencializar efeito cicatrizante, uma vez que foi determinado em estudos em animais que o polímero pode acelerar a regeneração do tecido da pele por aumento de síntese de colágeno, sendo uma boa escolha para formulações anti-inflamatórias (THANGAVEL *et al.*, 2020).

Em relação ao plastificante, o PEG 400 apresentou melhor performance. Ele possui natureza hidrofílica, favorecendo a difusão da água na matriz polimérica, o que influencia na maleabilidade dos filmes e na retirada da placa de vidro (CAO *et al.*, 2009). Foi mantido o mentol na mesma concentração que o gel-creme com a função de promover a penetração cutânea, e realizado a troca do sistema conservante devido a incompatibilidade do Ophthiphen® com os polímeros utilizados. A concentração do Germall™ 115 foi respeitada dentro dos limites da RDC N° 29 de 2012, que estabelece as concentrações de conservante para produtos cosméticos de higiene pessoal.

A formulação F6 escolhida para o teste de penetração é representada na Figura 22 no estado líquido, antes da laminação e no estado sólido, após a formação do filme (Figura 22).

Figura 22 - Formulação F6 nos estados líquido (esquerda) e sólido (direita).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

#### 5.5.4.1 Avaliação do peso médio do filme inerte

A realização do cálculo dos ativos por área de superfície do filme é realizada por meio da determinação do peso médio do filme inerte. Sendo assim, foi determinado o peso médio de 10 filmes tópicos e realizado a média, desvio padrão e coeficiente de variação. Os resultados podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Cálculo peso médio dos filmes tópicos.

<b>Amostra</b>	<b>Peso (mg) (filme tamanho 6x5 cm)</b>
1	161,998
2	160,995
3	163,998
4	162,995
5	160,765
6	161,999
7	159,978
8	160,010
9	160,878
10	161,586
Média	161,5202
Desvio Padrão	1,2122
Coeficiente de variação (%)	0,0075

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 5.5.4.2 Determinação do fator de correção

Como a formulação é feita pelo método de evaporação por solvente, foi necessário fazer o cálculo do FC para corrigir o peso total dos componentes da base não evaporados após a secagem. A soma das porcentagens de substâncias não evaporados da base de filme tópico é de 20,5%, o cálculo foi realizado conforme Equação 3.

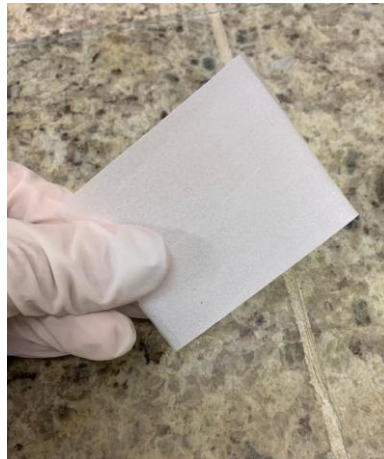
$$FC = \frac{100}{20,5} \quad FC = 4,87$$

Dessa forma, foi aplicado o FC 4,87 nos cálculos da base polimérica pesada.

#### 5.5.4.3 Incorporação do beta-sitosterol no filme tópico

Após a definição do peso médio e FC, foi realizado a incorporação do EST e  $\beta$ -SIT nos filmes na concentração de 6%, respectivamente. Porém, o EST apresentou incompatibilidade farmacotécnica com a base polimérica, apresentando cristalização, o que dificultou a retirada dos filmes da placa de vidro. Desse modo, o  $\beta$ -SIT foi incorporado sozinho na base polimérica na concentração de 6%. Os filmes apresentaram as seguintes características organolépticas, filme maleável, branco opaco e odor característico mentolado Figura 23.

Figura 23 - Filme tópico com beta-sitosterol 6%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

## 5.6 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESTIGMASTEROL E BETA-SITOSTEROL NAS FORMULAÇÕES E NA PELE

### 5.6.1 Otimização das condições cromatográficas

Análises cromatográficas de fitoesteróis são tradicionalmente realizadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), entretanto a técnica possui desvantagens, como temperaturas altas e procedimentos complexos de preparação de amostra, para alcançar a volatilidade, (SLAVIN; YU, 2012; MENÉNDEZ-CARRENO *et al.*, 2016).

Devido aos fatos relatados, somados a circunstância da análise dos fitoesteróis em uma matriz complexa como a pele, o método cromatográfico de escolha para a

quantificação foi o CLAE-UV-DAD. Contudo, a escolha do método analítico não deixou de ser desafiadora, uma vez que os fitoesteróis possuem baixa intensidade de absorção UV, devido à ausência de grupos cromóforos, além da absorção em comprimentos de ondas baixos entre 200 a 210 nm (NZEKOUÉ *et al.*, 2020; SEDBARE *et al.*, 2022). Ademais, a semelhança estrutural entre os fitoesteróis dificultou a separação dos mesmos formando co-eluições entre os compostos (SANTANATOGLIA *et al.*, 2023).

Apesar da dificuldade de separação entre os fitoesteróis, dados na literatura reportam a separação entre os compostos. Um estudo realizado por Santanatoglia *et al.* (2023) realizou a separação do colesterol e outros 7 tipos de fitoesteróis em amostras de legumes, usando uma coluna C18 (250 × 3.0 mm, 5 µm). e um gradiente começando com 3 fases móveis: água (70%), metanol (20%) e isopropanol (10%). Outro estudo realizado por Kolaric e Simko (2022) determinou o conteúdo de colesterol, EST e β-SIT em leites, usando uma coluna C18 (2,1 × 50 mm, 5 µm), eluição isocrática, com 2 fases móveis: acetonitrila (60%) e metanol (40%).

Dessa forma, foram testados uma variedade de colunas analíticas, fases móveis e sistemas de eluição para determinar a condição ideal utilizada nos testes baseados nos dados da literatura Tabela 17. Inicialmente o método foi desenvolvido de acordo com Hwang *et al.* (2014), com adaptações, utilizando uma coluna C18 (4,6 x250 mm; 5 µm; Agilent®) e fase móvel composta por água/acetonitrila H<sub>2</sub>O/ACN (A:B). Para isso, foi utilizada uma eluição isocrática 30:70 (A:B), com fluxo de 1 mL/min, temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção de 20 µL.

Tabela 17 - Otimização das condições cromatográficas para a quantificação do estigmasterol e beta-sitosterol retidos na pele.

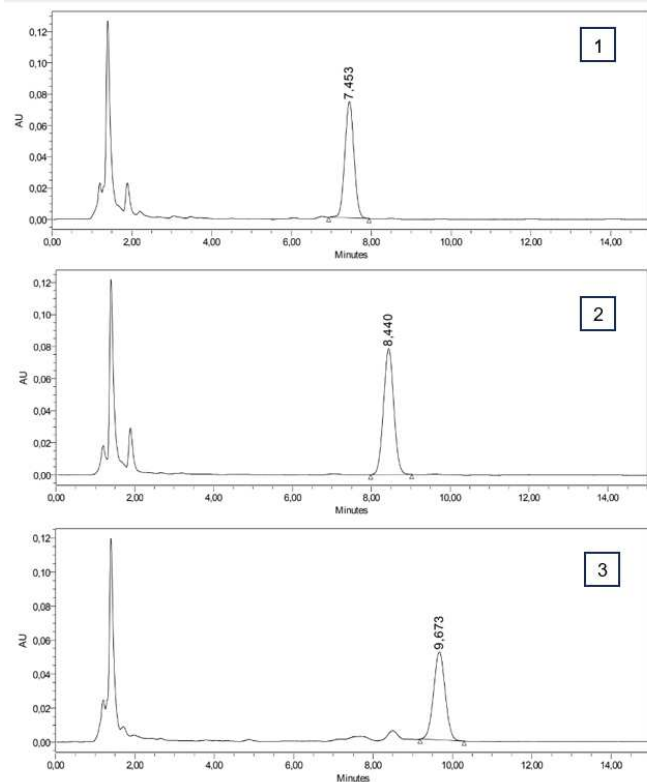
Coluna	Proporção FM	Fluxo mL/min	Temperatura da coluna (°C)	V (µL)
C8 fase reversa 250mm x 4,6mm (5 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30	1,00	40	20
	MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20	1,00	40	20
	ACN:H <sub>2</sub> O 80:20	1,00	50	20
	ACN: H <sub>2</sub> O 90:10	1,00	50	20
C18 fase reversa 250mm x 4,6mm (5 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30	1,00	40	20
	MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20	1,00	40	20
	ACN:MeOH 60:40	1,00	30	
	MeOH:H <sub>2</sub> O 98:02	1,00	25	50
<b>C18 fase reversa</b>				
<b>Eclipse Plus C18</b> <b>(4,6 x100 mm; 5 µm)*</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O 98:02</b>	<b>1,00</b>	<b>25</b>	<b>50</b>

Legenda: FM: fase móvel, VI: volume de injeção.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Mesmo após realizar alterações nas porcentagens de solventes, o método não apresentou boa separação entre os fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT, além de apresentar co-eluição do EST com o colesterol presente na pele, dificultando a separação dos compostos e a seletividade da análise (FENG *et al.*, 2020). Sendo assim, foi feita uma adaptação do método realizado por Delgado-Zamarreno *et al.* (2016), em que os três compostos foram eluídos eficientemente por uma mistura de MeOH:Água, isocrática, 98:02, respectivamente. O tempo total da corrida foi de 15 minutos e os padrões apresentaram os seguintes tempos de retenção de 7,45 (1), 8,44 (2), e 9,67 (4) min, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Cromatogramas CLAE-UV-DAD (210 nm). Padrões (1) colesterol, (2) estigmasterol (3) beta-sitosterol a 50 µg/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

### 5.6.2 Validação analítica

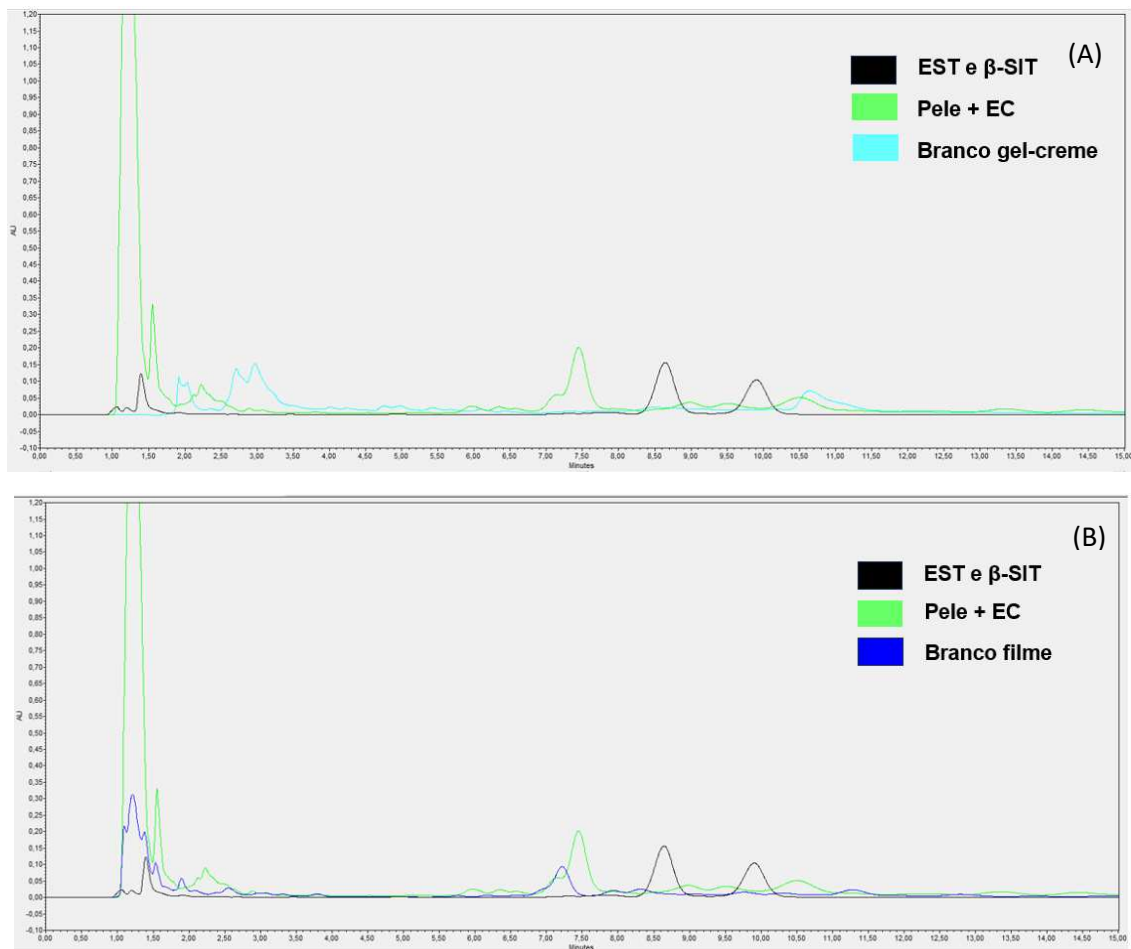
A etapa de validação analítica é o fator chave para a confiabilidade dos resultados apresentados no desenvolvimento de um método, apresentando um importante papel na qualidade e segurança dos dados analisados (GEETHA *et al.*, 2012). O processo de validação analítica é adotado para confirmar se a metodologia atende aos critérios e requisitos específicos das diretrizes da *United States Pharmacopeia* (USP), *International Council For Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e *Food and Drug Administration* (FDA) (RAVISANKAR *et al.*, 2015). Em termos de validação, os métodos analíticos abrangem três etapas básicas, como: medidas necessárias e apropriadas aos parâmetros de validação, planejamento experimental para avaliação desses parâmetros e determinação dos critérios de aceitação (OZKAN, 2018).

Os parâmetros analíticos analisados na validação do método do presente estudo foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LD e LQ., atendendo os critérios da RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

### 5.6.2.1 Seletividade

A seletividade é um dos parâmetros mais importantes na etapa de validação e avalia a presença de possíveis interferentes em amostras complexas. É o parâmetro que garante que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). A demonstração da seletividade foi realizada por meio da sobreposição dos cromatogramas com todos os interferentes presentes na análise da amostra (brancos das formulações filme tópico e gel-creme e homogeneizado da pele de orelha de porco). Os resultados podem ser observados nos cromatogramas abaixo (Figura 25).

Figura 25 - Sobreposição dos cromatogramas referentes à injeção de uma solução de estigmasterol e beta-sitosterol em metanol, pele de orelha de porco com estrato córneo e branco das formulações gel-creme e filme tópico



Legenda: (A) Seletividade gel-creme, cromatogramas padrões EST e  $\beta$ -SIT 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (preto), pele+EC (verde); branco gel-creme (azul). (B) Seletividade filme tópico, cromatogramas padrões EST e  $\beta$ -SIT 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (preto), pele+EC (verde); branco filme tópico (azul).

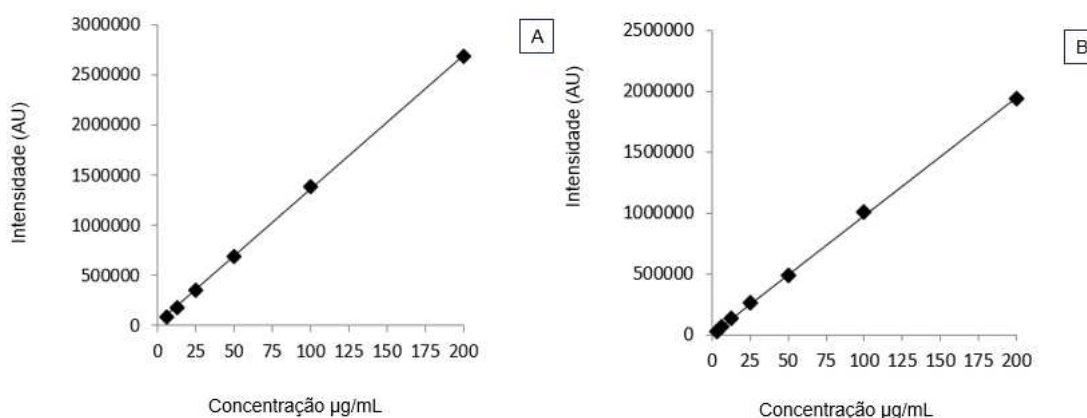
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através das análises qualitativas dos cromatogramas, foi verificado que a presença dos principais interferentes não gerou diferença na magnitude dos picos de EST e  $\beta$ -SIT, tornando o método desenvolvido seletivo para a quantificação desses fitoesteróis na presença de interferentes.

### 5.6.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito, dentro de uma faixa de aplicação (ICH, 2005). A faixa de aplicação verificada foi de 3,125 - 200  $\mu\text{g/mL}$  de soluções padrão de EST e  $\beta$ -SIT. Assim, foram avaliados os coeficientes de regressão angular (a), linear (b), e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Para obtenção da linearidade foram obtidas 3 curvas analíticas em dias alternados, sendo que as curvas analíticas obtidas podem ser observadas abaixo na Figura 26.

Figura 26 - Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE-UV-DAD para as soluções de estigmasterol em metanol (A) e beta-sitosterol em metanol (B) na faixa de concentração entre 3,125 a 200  $\mu\text{g/mL}$ .



Legenda: Equação da reta para o gráfico (A):  $y = 13418x + 17064$ ,  $r^2 = 0,9998$ . Equação da reta para o gráfico (B):  $y = 9725x + 10136$ ,  $r^2 = 0,9998$ .

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através do cálculo da regressão linear, foi verificado que o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido foi igual à 0,9998 para os dois fitoesteróis, valor este que



está de acordo com o limite estabelecido pela RE n° 166 de 2017 da ANVISA, em que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. O método desenvolvido, portanto, pode ser considerado linear para quantificação de EST e  $\beta$ -SIT na faixa de concentração que vai de 3,125  $\mu\text{g/mL}$  à 200,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.6.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão pode ser definida como o grau de proximidade dos resultados com as amostras obtidas por meio da validação do método. Esta é expressa por meio da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2017). Nas Tabelas 18 e 19 estão tabulados os resultados obtidos para este ensaio.

Tabela 18 - Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de estigmasterol em metanol

Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Precisão Intermediária Inter-corrida Dia 1 (n=6)			
10,0	8,60	0,81	99,32 – 101,68
30,0	29,47	1,76	98,08 – 102,86
90,0	93,94	1,17	98,47 – 101,85
Precisão Intermediária Inter-corrida Dia 2 (n=6)			
10,0	8,55	0,52	99,50 – 100,67
30,0	29,14	2,04	97,24 – 102,71
90,0	94,23	0,73	99,57 – 101,58
Repetibilidade Intra-corrida (n=6)			
10,0	8,61	0,82	99,08 – 101,44
30,0	29,53	1,76	97,68 – 102,43
90,0	94,09	1,18	99,25 – 102,03

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 19 - Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de beta-sitosterol em metanol.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Precisão Intermediária Inter-corrída Dia 1(n=6)			
10,0	8,59	0,85	99,39 – 101,46
30,0	34,64	1,24	98,70 – 101,70
90,0	103,35	0,94	99,29 – 101,57
Precisão Intermediária Inter-corrída Dia 2 (n=6)			
10,0	8,47	0,92	97,95 – 100,05
30,0	34,18	0,78	98,93 – 101,07
90,0	102,92	2,07	96,15 – 101,15
Repetibilidade Intra-corrída (n=6)			
10,0	8,59	0,86	98,50 – 100,04
30,0	34,49	1,25	98,33 – 101,32
90,0	103,29	0,95	98,92 – 101,19

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Através da análise das tabelas acima, a precisão foi avaliada e os valores de CV% foram de 0,52 a 2,04% para a EST e 0,78 a 2,07% para o  $\beta$ -SIT. Os dados estão de acordo com os limites determinados pela RDC nº 166, em que o valor máximo aceitável para o CV% é de 5% (ANVISA, 2017).

#### 5.6.2.4 Limite de detecção e Limite de quantificação

A definição de LD consiste na menor concentração do composto de interesse que pode ser detectada pela técnica analítica, enquanto o LQ é confirmado através da menor concentração do composto que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método. O cálculo do LD e LQ determinam a sensibilidade do método (RIBANI *et al.*, 2004). Existem três formas para calcular o LD e o LQ, que são: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica, porém o método pela curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística, devido ao fato dos outros dois métodos serem qualitativos (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Devido aos fatos mencionados acima, a determinação do LD e LQ foram baseadas em parâmetros da curva analítica representados na Tabela 20.

Tabela 20 - Dados encontrados de limite de detecção e limite de quantificação para a quantificação do estigmasterol e beta-sitosterol em metanol.

Compostos	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
EST	0,208	0,632
$\beta$ -SIT	0,879	2,662

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os valores de LD e LQ representados na tabela correspondem às menores quantidades do EST e  $\beta$ -SIT que podem ser detectadas e quantificadas com precisão e exatidão sendo, portanto, adequados para análise de fitoesteróis das amostras estudadas.

#### 5.6.2.5 Recuperação

A análise de recuperação faz parte da exatidão de uma validação analítica, sendo um parâmetro importante para determinar a capacidade do método em recuperar o analito em uma matriz complexa, como por exemplo a pele (TOLENTINO *et al.*, 2023). Segundo a RDC nº 166 de 2017, para determinação da exatidão de substâncias ativas, o método proposto utilizado é chamado de substância química de

referência (SQR). O método consiste em determinar a proporção da quantidade das substâncias extraídas das camadas da pele, através da quantidade inicialmente adicionada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). As porcentagens de recuperação do EST e  $\beta$ -SIT, podem ser observados nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Dados obtidos pela recuperação de estigmasterol em pele de orelha de porco.

Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)
56,64	38,81	67,66 $\pm$ 1,26
84,96	48,87	57,87 $\pm$ 0,60
113,28	69,73	62,33 $\pm$ 1,23

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 22 - Dados obtidos pela recuperação de beta-sitosterol em pele de orelha de porco.

Concentração teórica ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)
70,08	61,47	86,82 $\pm$ 2,62
113,28	104,61	92,35 $\pm$ 3,04
141,06	139,31	95,76 $\pm$ 3,13

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As porcentagens de recuperação variaram de 57,87 e 67,66% para o EST e 86,82 a 95,76% para o  $\beta$ -SIT. O coeficiente de variação entre as triplicatas foi menor que 15%, estando dentro da faixa recomendada para este tipo de ensaio (ICH, 2022).

## 5.7 ESTUDO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA *EX VIVO*

Os ensaios *ex vivo* foram realizados utilizando a pele de orelha de porco como barreira para penetração cutânea de fitoesteróis, devido à similaridade histológica com

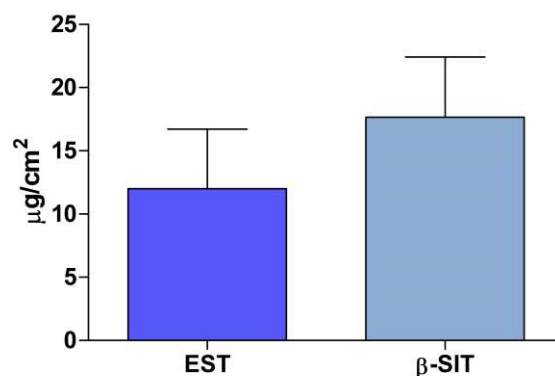
a pele do antebraço humano (BISGAARD *et al.*, 2023). Os fitoesteróis foram aplicados na superfície da pele e quantificados após 24 horas. As duas formulações desenvolvidas foram testadas: gel-creme e filme tópico nas concentrações de 6% de EST e  $\beta$ -SIT para gel-creme, e 6% de  $\beta$ -SIT para o filme tópico. As concentrações analisadas foram baseadas através de estudos da atividade anti-inflamatória da PHEX concentrada em fitoesteróis (PINTO, 2017).

A quantificação dos compostos foi monitorada em duas seções: 1) concentração retida na pele após 24 horas; 2) concentração permeada no meio receptor. Não foram quantificados os fitoesteróis que permaneceram no SC com a utilização do *tape stripping*, devido ao objetivo da formulação de alcançar as camadas da pele, epiderme viável e derme, onde encontram-se os principais mediadores inflamatórios (KREUTZ *et al.*, 2023; SAUCE *et al.*, 2021).

Nos ensaios de penetração cutânea em célula de *Franz*, a deposição dos compostos no compartimento doador é indicativa de absorção cutânea, enquanto a concentração acumulada no meio receptor é utilizada como um indicador de absorção sistêmica (LIN *et al.*, 2022). Foi realizada a quantificação dos fitoesteróis na epiderme viável e derme, porém no meio receptor não foi possível realizar a quantificação, visto que os valores apresentados estavam abaixo do limite de detecção.

Pensando nesse aspecto, o resultado foi promissor, devido ao fato da absorção sistêmica de fitoesteróis possuir efeitos adversos como, aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e alterar o balanço hormonal de testosterona e estradiol (SALEHI *et al.*, 2021). As quantidades de EST e  $\beta$ -SIT recuperadas da epiderme viável e derme do gel-creme podem ser observadas na Figura 27.

Figura 27 - Penetração cutânea do estigmasterol e beta-sitosterol em gel-creme, após 24 horas



Legenda: As barras representam o desvio padrão das sextuplicadas. Test *t student*, seguido pelo teste de *Mann-Whitney* foram utilizados como parâmetros estatísticos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o EST e o  $\beta$ -SIT.

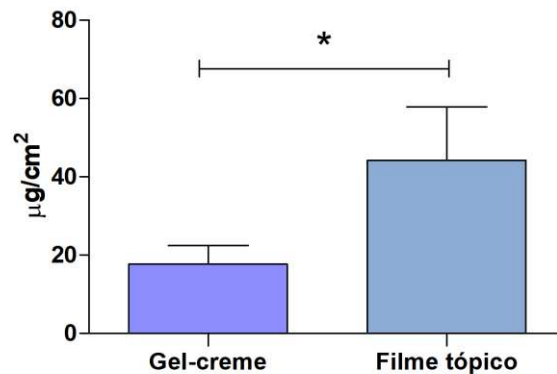
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após as 24 horas de análise, a quantidade cumulativa de EST e  $\beta$ -SIT que penetrou na epiderme viável e derme foram  $12,02 \pm 20,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $17,65 \pm 15,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Apesar da penetração cutânea do  $\beta$ -SIT ter sido maior que o EST, não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos. Existem poucos dados na literatura sobre penetração cutânea de fitoesteróis. Um estudo realizado por Chang *et al.* (2023) realizou a penetração cutânea de três fitoesteróis em soluções a 3mM, em que a maior penetrabilidade na pele foi prevista para o  $\beta$ -sitosterol (0,33 nmol/mg), seguido pelo campesterol (0,21 nmol/mg) e estigmasterol (0,16 nmol/mg).

A penetração cutânea de fitoesteróis tende a ser desafiadora devido às suas características físico-químicas limitadas, como tamanho molecular e *log P* altos, baixa solubilidade, alta cristalinidade e hidrofobicidade, fazendo com que seja necessário utilizar, solventes, surfactantes e cossolventes para melhorar a solubilidade e a dispersão (HU *et al.*, 2023; LU *et al.*, 2023). Os fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT possuem *log P* 6,98 e 7,24 respectivamente, indicando alta lipofilicidade, o que pode ocasionar o acúmulo dessas substâncias dentro da fase lipídica do EC prejudicando a passagem para a epiderme viável e derme (CHANG *et al.*, 2023; TAMPUCCI *et al.*, 2018).

Dessa forma, os excipientes utilizados na formulação, bem como a forma farmacêutica de escolha, podem auxiliar na penetração no EC e permeação das substâncias nas camadas mais profundas da pele (PRADAL *et al.*, 2019). Para contornar o desafio da penetração cutânea dos fitoesteróis frente as características físico-químicas apresentadas, formas farmacêuticas como gel-creme e filme tópico foram comparadas em relação a absorção cutânea do  $\beta$ -SIT (Figura 28).

Figura 28 - Penetração cutânea do beta-sitosterol no filme tópico e no gel-creme, após 24 horas.



Legenda: As barras representam o desvio padrão das sextuplicadas. Test *t student*, seguido pelo teste de *Mann-Whitney* foram utilizados como parâmetros estatísticos. \*Valores significativamente diferentes entre as formulações gel-creme e filme tópico ( $p < 0.05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O filme tópico contendo 6% de  $\beta$ -SIT exibiu maior penetração cutânea, estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) do que o gel-creme contendo 6% de  $\beta$ -SIT, média geométrica de absorção cumulativa ( $44,16 \pm 19,69$  vs  $17,65 \pm 15,68$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Se for expresso em porcentagem de dose aplicada em 24 horas a penetração cutânea foi de 1,24% para o filme tópico e 0,48% para o gel-creme, respectivamente. Ou seja, o filme tópico foi capaz de penetrar a epiderme viável e derme 2,5 vezes mais que o gel-creme.

Através dos dados apresentados, o filme tópico pode ter obtido uma penetração cutânea maior, devido a sua característica adesiva, formando uma fina camada polimérica na superfície da pele, induzindo o efeito oclusivo (BAKHRUSHINA *et al.*, 2022). A oclusão irá diminuir a perda de água da pele, o que conseqüentemente irá favorecer a absorção percutânea através da ampliação das lacunas dos intercorneócitos (PADULA *et al.*, 2019; ELMOWAFY, 2021). Além da oclusão, o filme tópico aplicado na pele é homogêneo distribuído, prolongando a sua substantividade na pele, o que irá estabelecer uma supersaturação transitória das substâncias favorecendo a penetração cutânea (KAPOOR; GRÄFE; HERBIG, 2022; REID *et al.*, 2009).

Ademais, o componente principal da formulação do filme tópico, o pullulan, pode ter favorecido a penetração cutânea. O pullulan têm sido amplamente utilizado no direcionamento de substâncias ativas através de várias formas farmacêuticas de

uso tópico, implantes, oculares, orais e líquidas. Em formulações tópicas, possui potencial promissor na entrega de substâncias ativas nas camadas da pele (SINGH *et al.*, 2023; DE SOUZA *et al.*, 2023). Na área cosmética, estudos recentes desenvolveram microagulhas solúveis a base de pullulan para otimização na entrega dérmica de moléculas com potencial cicatrizante (VORA *et al.*, 2020; YOUNAS *et al.*, 2023).

Outro fator observado no momento da análise de penetração cutânea foi a facilidade de aplicação do filme, quando comparado ao gel-creme. O filme aplicado na pele umedecida aderiu facilmente na pele de orelha de porco, formando uma fina camada adesiva. O gel-creme apresentou maior dificuldade de aplicação, não ocorrendo a formação de uma camada homogênea. Esse é um dos fatores que podem atrapalhar a penetração cutânea de formas farmacêuticas semissólidas e pensando em um tratamento tópico, poderá apresentar desvantagens como incerteza de dosagem, acúmulo das substâncias em áreas distintas e menor tempo de contato com a pele (SURBER; SMITH, 2005).



## 6 CONCLUSÃO

A caracterização química da PHEX de *P. aculeata* identificou e quantificou os fitoesteróis EST e  $\beta$ -SIT, metabólitos secundários com atividade anti-inflamatória amplamente relatados na literatura. Além disso, foram realizados estudos *in vitro*, sendo que a PHEX quando comparada aos compostos isolados exibiu menor citotoxicidade frente a células L929 e maior inibição do radical NO. A PHEX também apresentou uma menor toxicidade aguda no teste *in vivo* realizado com larvas *Z. morio*.

Através do levantamento das propriedades físico-químicas do EST e  $\beta$ -SIT, foi possível compreender as dificuldades de penetração cutânea e contornar os desafios por meio do desenvolvimento de duas formulações, gel creme e filme tópico. O filme tópico foi capaz de penetrar 2,5 vezes mais que o gel-creme. A maior penetração cutânea do filme tópico pode ter ocorrido devido ao potencial oclusivo, supersaturação do  $\beta$ -SIT no filme e os componentes utilizados na formulação.

Vale ressaltar que a metodologia analítica desenvolvida foi validada, apresentando seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LD e LQ. Ademais, o método foi capaz de recuperar o EST e  $\beta$ -SIT da pele.

Em face ao exposto, esse foi o primeiro estudo de penetração cutânea do EST e  $\beta$ -SIT em formulações, de forma que mais estudos devem ser realizados com o objetivo de avaliar a estabilidade e a caracterização físico-química das formulações desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

- ABOOSUCKER, S. I.; SUZA, W. P. Why do plants convert sitosterol to stigmasterol?. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 354, 2019.
- AGOSTINI-COSTA, T.S. *et al.* Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae–*Pereskia* sp. **Journal of functional foods**, v. 11, p. 178-184, 2014.
- AKINLOYE, O. A.; AKINLOYE, D. I.; ONIGBINDE, S. B.; METIBEMU, D. S. Phytosterols demonstrate selective inhibition of COX-2: in-vivo and in-silico studies of *Nicotiana tabacum*. **Bioorganic chemistry**, v.102, p. 104037, 2020.
- APOLINARIO, R. S.; MDGAM, C.; GONÇALVES, H. R. M.; MARTINS, I. C. F.; DE PAULA, R. M.; GRANATO, A. P. A.; RAPOSO, N. R. B. Compounded Orodispersible Films with Natural Ingredients for Halitosis: A Clinical Experience. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 22, n. 6, p. 512-515, 2018.
- BADIN, R. C.; MANAÇAS, L. R. A.; DE SOUZA, I. A. Avaliação toxicológica e determinação da dl 50 do extrato bruto de luffa operculate cogn.(cucurbitaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 7, p. 3830-3843, 2023.
- BAKCHI, B. *et al.* An overview on applications of SwissADME web tool in the design and development of anticancer, antitubercular and antimicrobial agents: A medicinal chemist's perspective. **Journal of Molecular Structure**, v. 1259, p. 132712, 2022.
- BAKHRUSHINA, Elena O. *et al.* Spray Film-Forming systems as promising topical in situ Systems: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2022.
- BISGAARD, S. I. *et al.* Dermal tissue penetration of in-plane silicon microneedles evaluated in skin-simulating hydrogel, rat skin and porcine skin. **Biomaterials Advances**, v. 155, p. 213659, 2023.
- BRAI, A. *et al.* *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2296, 2023.
- BRAIN, K. R. *et al.* In vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. **Toxicology in vitro**, v.21, n. 1, p.133-138, 2007.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6º edição ed. Brasília: **ANVISA**, 2019. v. 1.
- BRASIL. RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2017, 22.
- BIELFELDT, S. *et al.* Monitoring Dermal Penetration and Permeation Kinetics of Topical Products; the Role of Raman Microspectroscopy. **Trens in Analytical Chemistry**, v.156, p. 116709, 2022.
- BOLZINGER, M. A.; BRIANCON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

- BURLI, A.; LAW, R. M.; MAIBACH, H. I. Ability of mathematical models to predict human in vivo percutaneous penetration of steroids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 126, p. 105041, 2021.
- CABIANCA, A.; MULLER, L.; PAWLOWSKI, K.; DAHLIN, P. Changes in the plant  $\beta$ -sitosterol/stigmasterol ratio caused by the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 292, 2021.
- CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effect of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin film. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.729-735, 2009.
- CARDOSO, M. F. C. Dimetilssulfóxido (CAS No. 67-68-5). **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 344-352, 2011.
- CARVALHO, E.G. *et al.* Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 677-682, 2014.
- CHANG, Z. *et al.* The elucidation of structure–activity and structure-permeation relationships for the cutaneous delivery of phytosterols to attenuate psoriasiform inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 119, p. 110202, 2023.
- CHEN, K.; ZHENG, X.; WANG, S. N. Investigation on activated carbon-sodium polyacrylate coated aluminum sheets for desiccant coated heat exchanger. **Energy**, v. 245, p. 123206, 2022.
- CHEN, Y.; FENG, X. Gold nanoparticles for skin drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122122, 2022.
- CHU, D. H. Overview of biology, development, and structure of skin. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**, v.7, p. 57-73, 2008.
- CRUZ, T.M. *et al.* Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130078, 2021.
- DA ROCHA, L.P.B. *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282-e44101018282, 2021.
- DEAN, M.; MURPHY, B. T.; BURDETTE, J. E. Phytosteroids beyond estrogens: Regulators of reproductive and endocrine function in natural products. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 442, p. 98-105, 2017.
- DE BARROS, K. N. *et al.* Desenvolvimento de Formulação de uso Tópico com Ação Cicatrizante Contendo Extrato de *Pereskia aculeata*. **Iniciação Científica Cesumar**, 12(1), 2010.
- DE FREITAS, P. H. S. *et al.* Extratos glicólicos de “ora-pro-nobis”(Pereskia aculeata Miller): Avaliação do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 1748-1760, 2021.
- DELGADO-ZAMARRENO, M. M. *et al.* Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 192, p. 825-830, 2016.

- DE OLIVEIRA, D. *et al.* Liquid chromatography method to assay tretinoin in skin layers: validation and application in skin penetration/retention studies. **Heliyon**, v. 6, n. 1, 2020.
- DE SOUSA, J. P. A. *et al.* Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International Immunopharmacology**, v. 123, p. 110750, 2023.
- DE SOUZA, C. K. *et al.* Pullulan as a sustainable biopolymer for versatile applications: A review. **Materials Today Communications**, p. 106477, 2023.
- DERUYVER, L. *et al.* The importance of pre-formulation studies and of 3D-printed nasal casts in the success of a pharmaceutical product intended for nose-to-brain delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 175, p. 113826, 2021.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. Ed. Reino Unido. John Wiley & Sons, 2009.
- DI GIOIA, F.; PETROPOULOS, S. A. Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press, p. 351-421, 2019.
- DI FILLIPO, M. F.; ALBERTINI, B.; DOLCI, L. S.; BONVOCINI, F.; BIGI, A.; GENTILOMI, G. A.; PANZAVOLTA, S. Novel drug-loaded film forming patch based on gelatin and snail slime. **International Journal of Pharmaceutics**, v.598, p.120408, 2021.
- DINH, Hue *et al.* Microbiology's next top model: Galleria in the molecular age. **Pathogens and disease**, v. 79, n. 2, p. ftab006, 2021.
- DUARTE, M.R.; HAYASHI, S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005.
- ELMOWAFY, M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, p. 111748, 2021.
- FARFAN, J. A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, n. 1, p. 205-212, 1998.
- FRIEDMAN, N. *et al.* Physical properties of gold nanoparticles affect skin penetration via hair follicles. Nanomedicine: **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 36, p. 102414, 2021.
- FENG, S. *et al.* Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1243-1267, 2020.
- FERREIRA, A. O. *et al.* Orodispersible Films for Compounding Pharmacies. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 21, n. 6, p. 454-461, 2017.
- FILIPPIN, L. I. *et al.* Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FORMAN, S. *et al.* The effect of different solvents on the ATP/ADP content and growth properties of HeLa cells. **J Biochem Mo Toxicol**, v.13, p.11-15, 1999.

FÖRSTERMANN, U; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FREDERIKSEN, K.; GUY, R. H.; PETERSSON, K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 91, p. 9-15, 2015.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 346-351, 2006.

FURLAN, A. L. D.; FISCHER, M. L. Métodos alternativos ao uso de animais como recurso didático: um novo paradigma bioético para o ensino da zoologia. **Educação em Revista**, v. 36, 2020.

GAN, C.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; SHI, T.; HE, W. S.; JIA, C. A novel phytosterols delivery system based on sodium caseinate-pectin soluble complexes: Improving stability and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107295, 2022.

GARCÊS, A. *et al.* Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 159-167, 2018.

GARCIA, J. A. A. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food chemistry**, v. 294, p. 302-308, 2019.

GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, T.; RIETZ, R.; NEUBERT, R. H. H. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). **Die Pharmazie**, v. 57, n. 5, p. 320-322, 2002.

GEETHA, G. *et al.* Analytical method validation: an updated. **Review. Int. J. Pharm. Biol. Sci**, v. 1, p. 64-71, 2012.

GIRÃO, L. V. C. *et al.* Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nóbis. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 21, n. 2, p. 1-4, 2003.

GNIADDECKI, R. *et al.* Architecture of skin inflammation in psoriasis revealed by spatial transcriptomics. **Clinical Immunology**, v. 256, p. 109771, 2023.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, G. C. C. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Rev Virtual Quim**, v. 8, p. 2138-2146, 2016.

GOUSSARD, V.; AUBRY, J.; NARDELLO-RATAJ, V. Bio-based alternatives to volatile silicones: Relationships between chemical structure, physicochemical properties and functional performances. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 304, p. 102679, 2022.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v.126, n 1, p. 131-138, 1982.

GUILHERMINO, J.F.; SIANI, A.C.; QUENTAL, C.; BOMTEMPO, J.V. Desafios e Complexidade para Inovação a partir da Biodiversidade Brasileira. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 4, n. 1, p. 18-30, 2012.

GUIDELINE, I. C. H. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. **ICH harmonized guideline, Bioanalytical method validation**, v. 10, p. 2018, 2019.

HASANOVIC, A.; WINKLER, R.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of aciclovir. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 79, n.1, p. 76-81, 2011.

HEBLING, J. *et al.* Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. **Dental Materials**, v. 31, p.399-405, 2015.

HOEKSEMA, H. *et al.* Scar management by means of occlusion and hydration: a comparative study of silicones versus a hydrating gel-cream. **Burns**, v. 39, n. 7, p. 1437-1448, 2013.

HUANG, X. *et al.* Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation. **Materials Today Bio**, v. 11, p. 100124, 2021.

HU, Y. *et al.* Impact of molecular interactions between hydrophilic phytosterol glycosyl derivatives and bile salts on the micellar solubility of cholesterol. **Food Research International**, v. 167, p. 112642, 2023.

HWANG, J. T. *et al.* Simultaneous quantitation and validation of triterpenoids and phytosteroids in Phaseolus angularis seeds. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10309-10319, 2014.

ICH, **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use: Guideline on Validation of Analytical Procedures Q2.** (R1), Text and methodology, 2005.

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. Galleria mellonella (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC research notes**, v. 10, p. 1-8, 2017.

ISO, E. N. 10993-5: 2009—Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5: 2009). **German Version**, 2009.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N.; Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, 2007.

JYOTHI, V. *et al.* Film forming topical dermal spray of meloxicam attenuated pain and inflammation in carrageenan-induced paw oedema in Sprague Dawley rats. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 70, p. 103195, 2022.

- KAPOOR, K.; GRÄFE, N.; HERBIG, M. E. Topical film-forming solid solutions for enhanced dermal delivery of the retinoid tazarotene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2022.
- KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 5, p. 559-574, 2016.
- KATHE, K; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 12, n. 6, p. 487-497, 2017.
- KHAMRAI, M.; BANERJEE, S. L.; PAUL, S.; SAMANTA, S.; KUNDU, P. P. Curcumin entrapped gelatin/ionically modified bacterial cellulose based self-healable hydrogel film: An eco-friendly sustainable synthesis method of wound healing patch. **International journal of biological macromolecules**, v.122, p. 940-953, 2019.
- KHAN, R.A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, p. 1- 15, 2018.
- KOLARIČ, L.; ŠIMKO, P. Simultaneous determination of cholesterol, stigmasterol, and  $\beta$ -sitosterol contents in milk and dairy products. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 1, p. e16146, 2022.
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.
- KREUTZ, T. *et al.* Hydrogel-thickened nanoemulsion containing amazonian Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil: Skin permeation and in vivo anti-inflammatory efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 87, p. 104771, 2023.
- KRULL, S. M. *et al.* Critical material attributes of strip films loaded with poorly water-soluble drug nanoparticles: II. Impact of polymer molecular weight. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 106, n. 2, p. 619-628, 2017.
- KUROSAWA, Tsutomu Miki. Alternative Research (3Rs) in the World, Asia and Japan. In: **Alternatives to Animal Testing: Proceedings of Asian Congress 2016**. Springer Singapore, 2019. p. 33-36.
- KUSUMAH, J.; DE MEJIA, E. G. Impact of soybean bioactive compounds as response to diet-induced chronic inflammation: A systematic review. **Food Research International**, p. 111928, 2022.
- LABELLA-LORITE, M.; GONZALEZ, J.; FERNANDEZ-CAMPOS, F. In situ bioadhesive film-forming system for topical delivery of mometasone furoate: Characterization and biopharmaceutical properties. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 101852, 2020.
- LEE, C. H. *et al.* Skin atrophy caused by topical glucocorticoids is less common in patients with atopic dermatitis than in those with psoriasis. **Experimental dermatology**, v. 31, n. 2, p. 182-190, 2022.
- LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTÁČ, D.; MAJKIC, T.; BEKVALAC, K.; MIMICA-DUKIC, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.

LEONTI, M.; STAFFORD, G.I.; CERO, M.D.; CABRAS, S.; CASTELLANOS, M.E.; CASU, L.; WECKERLE, C.S. Reverse ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 417-431, 2017.

LEONG, W. *et al.* Preparation and characterization of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 77-83, 2011.

LESEIGNEUR, C.; BUCHRIESER, C. Modelling Legionnaires' disease: lessons learned from invertebrate and vertebrate animal models. **European Journal of Cell Biology**, p. 151369, 2023.

LIAO, P. C. *et al.* Identification of  $\beta$ -sitosterol as in vitro anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.66, n. 41, p.10748-10759, 2018.

LIEBELT, D. J.; JORDAN, J. T.; DOHERTY, C. J. Only a matter of time: The impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, p. 1409-1433, 2019.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; SOUZA, R. D. D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v.21, n.2, p.29-34, 2007.

LIN, C. *et al.* A systematic comparison of the effect of topically applied anthraquinone aglycones to relieve psoriasiform lesion: The evaluation of percutaneous absorption and anti-inflammatory potency. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112482, 2022.

LIU, Y.; LUNTER, D. J. Profiling skin penetration using PEGylated emulsifiers as penetration enhancers via confocal Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 166, p. 1-9, 2021.

LIU, C. *et al.* Investigation of the permeation enhancer strategy on benzoylecgonine transdermal patch: the relationship between transdermal enhancement strength and physicochemical properties of permeation enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 138, p. 105009, 2019.

LOZOYA-PÉREZ, N. E. *et al.* *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the *Sporothrix* species virulence. **Infection and Drug Resistance**, p. 2059-2072, 2021.

LU, X. *et al.* Process development of transforming phytosterols to steroidal pharmaceutical intermediates by *Mycolicibacterium neoaurum* with L-carnitine. **Process Biochemistry**, v. 131, p. 256-263, 2023.

MACIEL, F.S.M. ***Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE): uma hortaliça não convencional com potencial uso medicinal**. 2019. Dissertação – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; DE FREITAS, O.; FONSECA, M. J. V. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 342 n.1-2, p. 40-48, 2007.



MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 33-54, 2002.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química nova**, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

MA, L.; WILLEY, J. The interplay between inflammation and thrombosis in COVID-19: Mechanisms, therapeutic strategies, and challenges. **Thrombosis Update**, p. 100117, 2022.

MENÉNDEZ-CARRENO, M.; KNOL, D.; JANSSEN, Hans-Gerd. Development and validation of methodologies for the quantification of phytosterols and phytosterol oxidation products in cooked and baked food products. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 316-325, 2016.

MERCÊ, A.N.R.; LANDALUZE, J.S.; MANGRICH, A.S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M.R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Ni^{2+}$ . **Bioresource Technology**, v. 76, p. 29-37, 2001.

MICHNIAK-KOHN B.B.; WERTZ P.W.; AL-KHALILI M.; MEIDAN V.M. Skin: Physiology and Penetration Pathways. Delivery System Handbook for Personal **Care and Cosmetic Products**, p. 77-100, 2005.

MONTON, C.; SAMPAOPAN Y.; PICHAYAKORN, W.; PANRAT, K.; SUKSAEREE, J. Herbal transdermal patches made from optimized polyvinyl alcohol blended film: Herbal extraction process, film properties, and in vitro study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 69, p. 103170, 2022.

MORTON, J.F. Barbados Gooseberry. **Fruits of warm climates**. p. 349-351, Miami, 1987.

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

MUDGAL, J. *et al.* Remedial effects of novel 2, 3-disubstituted thiazolidin-4-ones in chemical mediated inflammation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, p. 34-42, 2014.

MUMTAZ, T. *et al.* Voriconazole nanoparticles-based film forming spray: An efficient approach for potential treatment of topical fungal infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 70, p. 102973, 2022.

NASERI, Alireza T. *et al.* A predictive transport model for convective drying of polymer strip films loaded with a BCS Class II drug. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 137, p. 164-174, 2019.

NEGISHI, Y.; SHIMA, Y.; TAKESHITA, T.; MORITA, R. Harmful and beneficial effects of inflammatory response on reproduction: sterile and pathogen-associated inflammation. **Immunological Medicine**, v.44, n. 2, p. 98-115, 2021.

NEPOMUCENO, L. L. *et al.* Padronização metodológica in vitro do ensaio colorimétrico MTT para avaliação da atividade de formazan e dosagem do fármaco: padronização do teste colorimétrico MTT. **Farmacologia Aplicada à Enfermagem: Aspectos Teóricos e Práticos**, p. 149-161, 2021.

- NGUYEN, T. H. *et al.* Anti-inflammatory properties of the ethanol extract from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz based on in vitro and in vivo studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 254, p. 112739, 2020.
- NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In: Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 3-11, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NZEKOUE, F. K. *et al.* Development of an innovative phytosterol derivatization method to improve the HPLC-DAD analysis and the ESI-MS detection of plant sterols/stanols. **Food Research International**, v. 131, p. 108998, 2020.
- OECD, O. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. *Env/Jm/Mono*, v. 2, p. 1-31, 2004.
- OLIVEIRA, E. M.; GOLDIM, J. R. Legislação de proteção animal para fins científicos e a não inclusão dos invertebrados-análise bioética. *Revista bioética*, v. 22, p. 45-56, 2014.
- OZKAN, Sibel A. Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis. **Pharm Sci**, v. 24, n. 1, p. 1-2, 2018.
- PACHECO, M. S. *et al.* A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan, maltodextrin, starch, and others. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 504-513, 2021.
- PADULA, C.; NICOLI, S., SANTI, P. Innovative formulations for the delivery of levofloxacin to the skin. **Int. J. Pharma**, v.372, 2009.
- PARIS, O. E. C. D. Organisation for Economic Cooperation and Development; 2004. *Employment Outlook*, 2004.
- PATIAL, P. K.; SUD, D. Bioactive phytosteroids from *Araucaria columnaris* (G. Forst.) Hook.: RP-HPLC-DAD analysis, in-vitro antioxidant potential, in-silico computational study and molecular docking against 3MNG and 1N3U. **Steroids**, v. 188, p. 109116, 2022.
- PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W., LADEMMAN, J. Skin penetration from the inside to the outside: A review. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 5, n. 2, p. e229-e235, 2008.
- PINTO, N.C.C. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller: a plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 12, p. 1780-1785, 2015a.
- PINTO, N.C.C. *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337, 2015b.
- PINTO, N.C.C. **ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE DAS FOLHAS DE *Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE)**. 2017. Tese – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

PRAÇA, F. S. G. *et al.* Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.

PRADAL, J. *et al.* Importance of the formulation in the skin delivery of topical diclofenac: not all topical diclofenac formulations are the same. **Journal of Pain Research**, v.12, p. 1149–1154, 2019.

RANADE, S. *et al.* Fabrication of topical metered dose film forming sprays for pain management. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 132-141, 2017.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. 8ª edição. Elsevier Brasil, 2012. p. 970-3.

RAVISANKAR, P. *et al.* A review on step-by-step analytical method validation. **IOSR J Pharm**, v. 5, n. 10, p. 7-19, 2015.

REDDY, N. *et al.* Alternatives to animal testing in toxicity testing: Current status and future perspectives in food safety assessments. **Food and Chemical Toxicology**, p. 113944, 2023.

REYES, R. *et al.* Skin penetration of caffeine from commercial eye creams and eye creams designed and optimized based on Hansen solubility parameters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 639, p. 122973, 2023.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RIBEIRO, I. M. M. *et al.* Antileishmania and immunomodulatory potential of cashew nut shell liquid and cardanol. **Toxicology in Vitro**, v. 87, p. 105524, 2023.

ROCHA, D. R. C.; JÚNIOR, G.A.P.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A.S; PINTO, N.A.V.D. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2008.

ROSSETO, H. C. *et al.* Design of propolis-loaded film forming systems for topical administration: The effect of acrylic acid derivative polymers. **Journal of Molecular Liquids**, v. 322, p. 114514, 2021.

RAPOSO, F. J. *et al.* Possible Applications to the Individualized Treatment for Erectile Dysfunction. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 7, p. 2824-2831, 2017.

REID, L.; JONES, S. A.; BROWN, M. B. Transient drug supersaturation kinetics of beclomethasone dipropionate in rapidly drying films. **International journal of pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 114-119, 2009.

ROSA, S.M.; DA SOUZA, L.A. Morphology, and anatomy of the fruit (hypanthium, pericarp and seed) development of *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 415-428, 2003.

- SANTANATOGLIA, A. *et al.* Development and application of a novel analytical method for the determination of 8 plant sterols/stanols in 22 legumes samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 118, p. 105195, 2023.
- SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E.; LADEMANN, J. Skin penetration. In: **Contact dermatitis**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 215-227.
- SCHMÖLZ, L.; WALLERT, M.; LORKOWSKI, S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. **Journal of immunological methods**, v. 449, p. 68-70, 2017.
- SEDBARE, R. *et al.* Development and Validation of the UPLC-DAD Methodology for the Detection of Triterpenoids and Phytosterols in Fruit Samples of *Vaccinium macrocarpon* Aiton and *Vaccinium oxycoccos* L. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4403, 2022.
- SEN'KOVA, A. V. *et al.* Protective effect of soloxolone derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: Pharmacological profiling and their effects on key inflammation-related processes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 159, p. 114231, 2023.
- SOUZA, L.F. *et al.* *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: chemical composition and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1478, 2016.
- SALEHI, B. *et al.* Phytosterols: From preclinical evidence to potential clinical applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1819, 2021.
- SAKWANICHOL, J.; SUNGTHONGJEEN, S.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Preparation and characterization of chitosan aqueous dispersion as a pharmaceutical film forming material. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101230, 2019.
- SAUCE, R. *et al.* Ex vivo penetration analysis and anti-inflammatory efficacy of the association of ferulic acid and UV filters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 156, p. 105578, 2021.
- SCHMÖLZ, L.; WALLERT, M.; LORKOWSKI, S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. **Journal of immunological methods**, v. 449, p. 68-70, 2017.
- SERHAN, C. N. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. **Anesthesiology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 341-364, 2006.
- SHARIF, K. M. *et al.* Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1314-1322, 2015.
- SILVA, F.G.; OLIVEIRA, G.L. Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 98-103, 2013.
- SILVA, F. V. F. *et al.* Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaifera officinalis* L.(copaíba). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v.30, p. 974, 2019.

SINGH, R. S. *et al.* Pullulan in pharmaceutical and cosmeceutical formulations: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 123353, 2023.

SINGHAPHAN, Pitcha; UNOB, Fuangfa. Thread-based platform for nitrite detection based on a modified Griess assay. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 327, p. 128938, 2021.

SLAVIN, M.; YU, L. L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2789-2795, 2012.

SOLÍS, A. C., Bento, D., Nunes, S., Valente, A., Pais, A., Vitorino, C. Rethinking transdermal drug delivery using PVA-NLC based films. **Polymer**, v. 230, p. 124 -032, 2021

SURBER, C.; SMITH, E. W. The mystical effects of dermatological vehicles, **Dermatology**, v. 210, n. 2, p. 157-168, 2005.

TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C.; MOTTA, E.M.P.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148-160, 2009.

TANG, J. J. *et al.* Phytosterol profiles and iridoids of the edible *Eucommia ulmoides* Oliver seeds and their anti-inflammatory potential. **Food Bioscience**, v. 43, n. 101295, 2021.

TAPFUMAYENI, P.; IMRAN, M., MOHAMMED, Y. H., ROBERTS, M. Recent Advances and Future Prospective of Topical and Transdermal Delivery Systems. **Frontiers in Drug Delivery**, v. 25, 2022.

TAMPUCCI, S. *et al.* Cutaneous permeation and penetration of sunscreens: Formulation strategies and in vitro methods. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 1, 2017.

THAKUR, A. *et al.* Pullulan based polymeric novel drug delivery systems: A review on current state of art and prospects. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 105117, 2023.

THANGAVEL, P. *et al.* Topical administration of pullulan gel accelerates skin tissue regeneration by enhancing collagen synthesis and wound contraction in rats. **International journal of biological macromolecules**, v. 149, p. 395-403, 2020.

TIAN, C. *et al.* Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 257-264, 2021.

TOLENTINO, S. *et al.* Curcumin quantification in skin and mucosa: Optimization of extraction and chromatographic method validation. **Journal of Chromatography B**, v. 1217, p. 123623, 2023.

TORRES, T. M. S. *et al.* Protein valorization from ora-pro-nobis leaves by compressed fluids biorefinery extractions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 76, p. 102926, 2022.

TSAKOVSKA, I. *et al.* Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v. 387, p. 27-42, 2017.

- TURKOVIĆ, E. *et al.* Orodispersible films Pharmaceutical development for improved performance: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 103708, 2022.
- VARGAS-MAYA, N. I. *et al.* Refinement of the Griess method for measuring nitrite in biological samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 187, p. 106260, 2021.
- VIGH, T.; HORVATHÓVÁ; T.; BALOGH, A. S, P. L.; DRAVAVOLGVI, G.; Nagy, Z. K.; Marosi, G. Polymer-free and polyvinylpyrrolidone-based electrospun solid dosage forms for drug dissolution enhancement. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49(4), p. 595-602, 2013.
- VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Production and applications of 1, 3-propanediol. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering. Elsevier**, p. 719-738, 2017.
- VORA, L. K. *et al.* Pullulan-based dissolving microneedle arrays for enhanced transdermal delivery of small and large biomolecules. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 290-298, 2020.
- VOSS, G. T. *et al.* Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. **Materials Science and Engineering**, v. 114, p. 111074, 2020.
- WANG, J. *et al.* Percutaneous penetration enhancement effect of essential oil of mint (*Mentha haplocalyx* Briq.) on Chinese herbal components with different lipophilicity. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 2, p. 109-119, 2014.
- WANG, Z. *et al.* Preparation and evaluation of chitosan-and hyaluronic acid-grafted pullulan succinate films for skin wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 1432-1442, 2022.
- WU, D. *et al.* Honeys with anti-inflammatory capacity can alter the elderly gut microbiota in an ex vivo gut model. **Food Chemistry**, p. 133229, 2022.
- YANG, D. *et al.* A systematic approach to determination of permeation enhancer action efficacy and sites: Molecular mechanism investigated by quantitative structure– activity relationship. **Journal of Controlled Release**, v. 322, p. 1-12, 2020.
- YOUNAS, A. *et al.* A chitosan/fucoidan nanoparticle-loaded pullulan microneedle patch for differential drug release to promote wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 306, p. 120593, 2023.
- ZATZ, J. Rationale and approaches to skin permeation In: *Skin Permeation – Fundamentals and application. Wheaton: Allured Publishing Corporation*, p.11-31, 1993.
- ZHANG, H. *et al.* Tourmaline nanoparticles modifying hemostatic property of chitosan/polyvinyl alcohol hydrogels. **Materials Letters**, v. 324, p.132718, 2022.
- ZHANG, X.; LIN, K.; LI, Yi. Highlights to phytosterols accumulation and equilibrium in plants: Biosynthetic pathway and feedback regulation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 155, p. 637-649, 2020.

ZHENG, Y. *et al.* A reactive oxygen/nitrogen species-eliminating natural product-based nanomedicine for prevention and treatment of inflammatory liver injury. **Chemical Engineering Journal**, v. 472, p. 144952, 2023.

ZHOU, J. *et al.* Reactive oxygen species-sensitive materials: A promising strategy for regulating inflammation and favoring tissue regeneration. **Smart Materials in Medicine**, v. 4, p.427 – 46, 2023.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química nova**, v. 33, p. 1421-1428, 2010.