

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

Carolina Sousa Ponciano

Nanoemulsões de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*: desenvolvimento,
caracterização e potencial para cicatrização da pele

Juiz de Fora
2024

Carolina Sousa Ponciano

Nanoemulsões de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*: desenvolvimento, caracterização e potencial para cicatrização da pele

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito total para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Coorientador: Profa. Dra. Thais Nogueira Barradas

Juiz de Fora

2024

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

Ponciano, Carolina Sousa.

Nanoemulsões de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* : desenvolvimento, caracterização e potencial para cicatrização da pele / Carolina Sousa Ponciano. -- 2024.

105 f. : il.

Orientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela

Coorientadora: Thais Nogueira Barradas

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Tensoativos biodegradáveis. 2. Estabilidade dependente do pH. 3. Estabilidade coloidal. 4. Aplicações tópicas. 5. Cicatrização de feridas. I. Vilela, Fernanda Maria Pinto, orient. II. Barradas, Thais Nogueira, coorient. III. Título.

Carolina Sousa Ponciano

Nanoemulsões de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*: desenvolvimento, caracterização e potencial para cicatrização da pele

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 28 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Thaís Nogueira Barradas - Coorientadora

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Yris Maria Fonseca Bazzo

Universidade de Brasília

Dr. Wilson Rodrigues Braz

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 21/11/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 29/11/2024, às 08:47, 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 **Yris Maria Fonseca Bazzo, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 15:03, 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 **Wilson Rodrigues Braz, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 16:32, 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 **Thaís Nogueira Barradas, Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 21:48, 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) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2111971** e o código CRC **8433CBDC**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Katia e Niraldo, por sempre me incentivarem a estudar e por me ensinarem que o conhecimento nunca é demais. Sou profundamente grata por todo o apoio que me deram para que eu pudesse chegar até aqui.

Às minhas orientadoras, Fernanda e Thais, deixo meu sincero agradecimento. Fernanda, obrigada por estar ao meu lado nos momentos em que os resultados esperados não vieram; sua tranquilidade e orientação foram fundamentais para me guiar nos momentos de necessidade. Depois de muitos desafios, conseguimos chegar até aqui. Thais, agradeço por me inspirar a sonhar alto, por ter me acolhido prontamente desde nosso primeiro contato, e por me mostrar o valor que a orientação traz para a jornada de uma pós-graduação.

Ao meu companheiro, Jhan Pierre, sou grata por estar comigo durante as longas horas de estudo, experimentos e estrada, me apoiando e me dando força nos dias mais desafiadores. Obrigada por ter embarcado comigo neste desafio, muitas vezes assumindo nossa parte para que eu pudesse dedicar à minha carreira profissional.

Aos meus amigos Cassiano, Damaris, José Ângelo, Sara, Camila, Lucas, Larissa, Julia e Carmine, agradeço por sempre estarem prontos para me ouvir e pela paciência nesse processo. Vocês são incríveis, e sou muito sortuda por ter vocês.

Agradeço também à empresa Amantikir Origem Natural, que inspirou a pesquisa sobre o alecrim-do-campo e pela generosa doação do óleo, contribuindo para o fomento da pesquisa científica.

Por fim, sou grata aos meus colegas, Fernanda Brito, Carine e Julliana, que me apoiaram nas análises, interpretação dos resultados e redação. Agradeço aos professores Luiz Fernando Cappa e Ana Claudia Chagas pela disponibilidade, abertura e orientação nas análises realizadas em seus laboratórios, e aos membros da banca, por terem aceitado participar deste processo e por suas valiosas contribuições!

RESUMO

Alquil poliglicosídeos (APG) são surfactantes não iônicos provenientes de fontes renováveis, com propriedades ecotoxicológicas favoráveis e alta biodegradabilidade, tornando-os atrativos para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas seguras e sustentáveis. O óleo essencial de *B. dracunculifolia* (BDO), rico em compostos bioativos como β -cariofileno e *t*-nerolidol, possui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, conferindo-lhe potencial para aplicações tópicas voltadas para cicatrização de feridas. Neste contexto, este estudo objetivou desenvolver uma nanoemulsão inovadora livre de polietilenoglicóis (PEG), usando um surfactante APG para encapsular o BDO, caracterizando sua estabilidade, propriedades físico-químicas e potencial segurança. Adicionalmente, o estudo investigou o comportamento pH-dependente dos surfactantes APG e sua influência na estabilidade e uniformidade das nanoemulsões, um aspecto pouco explorado na ciência farmacêutica até hoje. Este estudo analisou ainda os teores de *t*-nerolidol e β -cariofileno no BDO, avaliou sua toxicidade em células de fibroblastos humanos e o seu efeito na migração celular. A determinação dos teores de *t*-nerolidol e β -cariofileno no óleo essencial por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelou a presença de 13,84% de *t*-nerolidol e 2,68% de β -cariofileno. Testes de citotoxicidade mostraram que o BDO não apresentou toxicidade até concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$, e os ensaios de migração celular demonstraram seu potencial para a cicatrização, com taxas de fechamento de feridas significativamente superiores ao controle: cerca de 71% e 78% em 24 e 48 horas, respectivamente, em comparação a 43% e 51% no mesmo intervalo, indicando o seu potencial para a reparação da pele. Através da construção de um diagrama de fases ternário, quatro formulações foram selecionadas e processadas no ultrassom, resultando em aspecto translúcido característico de suspensões coloidais nanométricas. As formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) e condutividade durante 90 dias. As nanoemulsões produzidas com a proporção surfactante:BDO de 1:1, produziram gotículas menores que 60 nm e baixa polidispersidade ($\text{Pdl} < 0,2$). O pH inicial das formulações foi elevado ($\text{pH} > 11$), devido ao APG. Após ajustes para pH 6,5,

observou-se um aumento no diâmetro das gotas para 78 nm e o Pdl para 0,3, sugerindo uma alteração na atividade interfacial do surfactante. Após 90 dias, a nanoemulsão com pH 6,5 estabilizou-se com diâmetro de gota em torno de 120 nm e $Pdl < 0,3$, indicando um sistema monodisperso. A nanoemulsão em pH 11,5 apresentou instabilidade precoce, com $Pdl > 0,3$ após 21 dias, sugerindo coalescência. As análises espectroscópicas confirmaram alterações conformacionais no APG e no BDO relacionadas às variações de pH, apoiando a hipótese de mudanças conformacionais dependentes de pH no APG. Além disso, o teste HET-CAM indicou menor escore de irritação ($IS\ 3,0 \pm 0,0$) para nanoemulsão em pH 6,5 comparado ao 11,5 ($IS\ 3,6 \pm 1,15$), reforçando a importância do controle do pH para a segurança de formulações tópicas. Este trabalho enfatiza o potencial das nanoemulsões baseadas em APG em produtos farmacêuticos mais seguros e sustentáveis, destacando o comportamento sensível ao pH deste sistema.

Palavras chave: Tensoativos biodegradáveis; Estabilidade dependente do pH; Estabilidade coloidal; Aplicações tópicas; Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Alkyl polyglucosides (APG) are nonionic surfactants derived from renewable sources, with favorable ecotoxicological properties and high biodegradability, making them attractive for the development of safe and sustainable pharmaceutical formulations. The essential oil of *Baccharis dracunculifolia* (BDO), rich in bioactive compounds such as β -caryophyllene and t-nerolidol, possesses antimicrobial and anti-inflammatory properties, granting it potential for topical applications aimed at wound healing. In this context, this study aimed to develop an innovative polyethylene glycol (PEG)-free nanoemulsion using an APG surfactant to encapsulate BDO, characterizing its stability, physicochemical properties, and potential safety. Additionally, the study investigated the pH-dependent behavior of APG surfactants and their influence on the stability and uniformity of nanoemulsions, an aspect scarcely explored in pharmaceutical science to date. This study also analyzed the contents of t-nerolidol and β -caryophyllene in BDO, evaluated its toxicity in human fibroblast cells, and assessed its effect on cell migration. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed the presence of 13.84% t-nerolidol and 2.68% β -caryophyllene in the essential oil. Cytotoxicity tests showed that BDO exhibited no toxicity up to concentrations of 500 $\mu\text{g/mL}$, and cell migration assays demonstrated its potential for wound healing, with wound closure rates significantly higher than the control: approximately 71% and 78% at 24 and 48 hours, respectively, compared to 43% and 51% in the same intervals, indicating its potential for skin repair. Through the construction of a ternary phase diagram, four formulations were selected and processed by ultrasound, resulting in the translucent appearance characteristic of nanometric colloidal suspensions. The formulations were evaluated for mean hydrodynamic droplet diameter, polydispersity index (Pdl), zeta potential (ZP), and conductivity over 90 days. Nanoemulsions prepared with a surfactant:BDO ratio of 1:1 produced droplets smaller than 60 nm with low polydispersity (Pdl < 0.2). The initial pH of the formulations was high (pH > 11) due to the APG. After adjustments to pH 6.5, an increase in droplet size to 78 nm and Pdl to 0.3 was observed, suggesting alterations in the interfacial activity of the surfactant.

After 90 days, the nanoemulsion at pH 6.5 stabilized with a droplet size of approximately 120 nm and Pdl < 0.3, indicating a monodisperse system. Conversely, the nanoemulsion at pH 11.5 exhibited early instability, with Pdl > 0.3 after 21 days, suggesting coalescence. Spectroscopic analyses confirmed conformational changes in the APG and BDO related to pH variations, supporting the hypothesis of pH-dependent conformational changes in APG. Moreover, the HET-CAM test indicated a lower irritation score (IS 3.0 ± 0.0) for the nanoemulsion at pH 6.5 compared to pH 11.5 (IS 3.6 ± 1.15), reinforcing the importance of pH control for the safety of topical formulations. This work highlights the potential of APG-based nanoemulsions for safer and more sustainable pharmaceutical products, emphasizing the pH-sensitive behavior of this system.

Keywords: Biodegradable surfactants; pH-dependent stability; Colloidal stability; Topical applications; Wound healing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	12
2.2 PRODUTOS NATURAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	17
2.3 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	21
2.4 NANOEMULSÕES	27
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO BDO IN VITRO	36
4.1.1 Cultura de células	36
4.1.2 Preparação das células	36
4.1.3 Teste de citotoxicidade	37
4.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO CELULAR DO BDO <i>IN VITRO</i> (Scratch assay)	37
4.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES TERNÁRIO	38
4.4 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	39
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E DETERMINAÇÃO DE TRANS-NEROLIDOL E β -CARIOFILENO NO BDO	40
4.5.1 Diâmetro hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersão (Pdl), Potencial Zeta (PZ) e Condutividade	40
4.5.2 Determinação dos teores de nerolidol e β -cariofileno no BDO e na nanoemulsão por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
4.5.3 Determinação dos teores de nerolidol e β -cariofileno por CLAE nas nanoemulsões	43
4.5.4 Espectroscopia Raman e espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)	43
4.6 TENSÃO SUPERFICIAL	44
4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO PELO TESTE COM MEMBRANA CORIOALANTOICA DO OVO DE GALINHA (HET-CAM)	44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CITOTOXICIDADE DO BDO	47
5.2 TAXA DE MIGRAÇÃO CELULAR DO BDO	49
5.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES TERNÁRIO	52
5.4 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	54
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	56
5.5.1 Diâmetro hidrodinâmico médio, Pdl, PZ e condutividade	56
5.5.2 Determinação dos teores de β -cariofileno e nerolidol no BDO e nas nanoemulsões	68
5.5.3 Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada	

de Fourier (FTIR)	75
5.5.4 Tensão Superficial	78
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO POR HET-CAM	79
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo e essencial para a recuperação da integridade da pele e dos tecidos subjacentes após as lesões. Esse fenômeno envolve uma sequência coordenada de eventos celulares e moleculares, como hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação do tecido, sendo essencial para a manutenção da homeostase (Rodrigues *et al.*, 2019). Contudo, fatores como infecções, doenças crônicas e a idade avançada, podem comprometer a eficácia desse processo, resultando em feridas de difícil cicatrização, que frequentemente levam a complicações graves (Deng *et al.*, 2021). Assim, o desenvolvimento de terapias que aceleram a regeneração tecidual e reduzem a inflamação é essencial para a recuperação eficiente dessas lesões.

Embora este trabalho aborde o tema das feridas de maneira abrangente, é importante destacar as feridas crônicas, dado o impacto substancial que essas lesões têm na saúde global. Feridas crônicas constituem um desafio significativo, afetando a qualidade de vida dos pacientes e acarretando altos custos para os sistemas de saúde (Graves e Zheng, 2014; Nussbaum *et al.*, 2018; Phillips *et al.*, 2016). No estudo de Queen e Harding (2023), foi realizada uma avaliação dos custos anuais estimados para o tratamento de feridas em diferentes regiões do mundo. Os resultados indicaram que, em 2019, os Estados Unidos apresentaram os maiores gastos (US\$ 126,9 bilhões), enquanto o Brasil ocupou a 8ª posição (US\$ 6,4 bilhões) (Queen e Harding, 2023). Uma análise atualizada conduzida pelos mesmos pesquisadores em 2022 revelou que os custos nos Estados Unidos aumentaram para US\$ 148,7 bilhões, enquanto o Brasil manteve-se na 8ª posição, com gastos de US\$ 11,2 bilhões (R\$ 28,8 bilhões) (Queen e Harding, 2024).

Observa-se um crescente interesse em tratamentos que utilizam produtos naturais, reconhecidos por seu potencial terapêutico e multifuncionalidade. Plantas medicinais, amplamente empregadas tanto na medicina tradicional quanto moderna, são fontes ricas de compostos bioativos que demonstram propriedades promissoras

no tratamento de feridas (Rajput e Kumar, 2020). Um exemplo notável é a planta *Baccharis dracunculifolia*, nativa do Brasil, destaca-se nesse cenário devido às suas comprovadas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, atribuídas principalmente à presença de compostos como sesquiterpenos, entre eles o nerolidol e o β -cariofileno (Cazella *et al.*, 2019; Fabri *et al.*, 2011; Ferronato *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2011; Santos, dos *et al.*, 2010). Estudos sugerem que o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (BDO), pode atuar na modulação da resposta inflamatória e atuar como antimicrobiano (Brandenburg, 2020; Cazella *et al.*, 2019). A exploração científica de produtos naturais, como o BDO, não apenas ressalta a importância de preservar a biodiversidade, mas também oferece a oportunidade de descobrir novos ativos terapêuticos, explorar abordagens inovadoras para o tratamento de doenças e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos.

Entretanto, um dos desafios no uso de óleos essenciais em formulações tópicas é a sua baixa solubilidade em sistemas aquosos e, consequentemente, sua limitada biodisponibilidade (Barradas e Holanda e Silva, de, 2021). Para superar esse obstáculo, a nanotecnologia tem sido amplamente explorada, especialmente por meio do uso de nanoemulsões. As nanoemulsões são dispersões de gotículas de óleo em água, que oferecem vantagens em relação às emulsões convencionais, como maior estabilidade, melhor absorção cutânea e aumento da biodisponibilidade de compostos bioativos (Naseema *et al.*, 2021). Elas têm demonstrado ser uma solução eficaz para a encapsulação de compostos lipofílicos, como os presentes no BDO, possibilitando aumento da solubilidade, liberação controlada e prolongada desses ativos em aplicações dermatológicas voltadas à cicatrização de feridas.

Diante desse cenário, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver nanoemulsões contendo o BDO e investigar suas estabilidades, como potencial para futuras aplicações terapêuticas. A combinação de ativos naturais com nanotecnologia tem o potencial de superar desafios e criar novas soluções terapêuticas. Assim, o desenvolvimento de nanoemulsões estáveis com o BDO representa um passo importante para tratamentos mais eficazes e seguros voltados à cicatrização de feridas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A pele, o maior órgão do corpo humano, é uma estrutura complexa composta por camadas distintas, cada uma desempenhando um papel importante na manutenção da saúde cutânea (Harris-Tryon e Grice, 2022). Além de sua função primária de barreira física, a pele também regula a temperatura corporal, previne a desidratação, protege contra a radiação solar e atua como linha de defesa contra patógenos e substâncias tóxicas (Smythe e Wilkinson, 2023). No entanto, sua constante exposição a fatores externos a torna suscetível a lesões, que podem ter consequências significativas tanto para os indivíduos afetados quanto para os sistemas de saúde.

Feridas são definidas como interrupções na continuidade anatômica e funcional dos tecidos, podendo ser causadas por agentes físicos, químicos, térmicos, microbiológicos ou imunológicos (Md, Bhuvaneshwari e Roopa, 2023). Essas lesões podem ocorrer em qualquer fase da vida e variam de feridas superficiais a feridas crônicas complexas. Enquanto as feridas agudas tendem a cicatrizar de forma previsível, as feridas crônicas apresentam um processo de cicatrização mais lento ou até mesmo pioram com o tempo (Leonida e Kumar, 2016). Dependendo da profundidade, as feridas podem ser classificadas como superficiais, de espessura parcial ou dérmicas profundas, afetando diferentes camadas da pele e os tecidos subjacentes (Kordestani, 2019). A natureza da lesão, o momento da intervenção e a profundidade da ferida são fatores determinantes para o processo de cicatrização e o tratamento adequado (Percival, 2002).

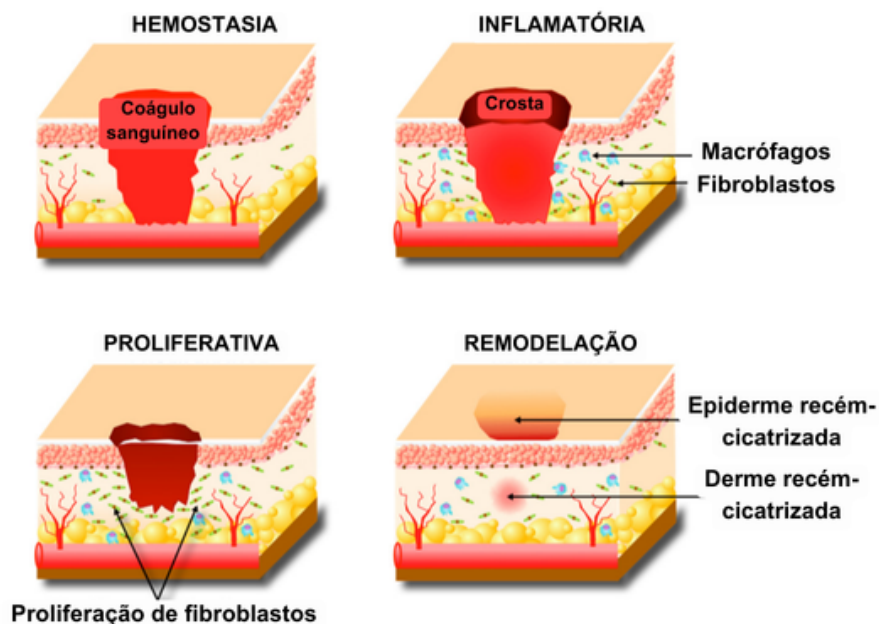
A cicatrização de feridas é um dos processos biológicos mais complexos do corpo humano, sendo composto por quatro fases interdependentes: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Figura 1). Essas etapas não ocorrem de maneira isolada, mas interagem de forma contínua, garantindo que a cicatrização

prossiga sem interrupções desde a resposta inicial à lesão até a formação do tecido reparado (Wallace, Basehore e Zito, 2024). Cada uma dessas fases envolve interações celulares e moleculares que visam restaurar a integridade do tecido danificado (Rodrigues *et al.*, 2019).

A hemostasia é a primeira resposta após a lesão, com objetivo de interromper a perda de sangue por meio da vasoconstrição com a formação de um coágulo (Velnar, Bailey e Smrkolj, 2009). Conforme ilustrado na Figura 1, o coágulo desempenha um papel essencial ao estancar o sangramento. Além disso, ele libera fatores de crescimento importantes, como o fator de crescimento transformador (TGF)- β , o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), que preparam o ambiente para a fase inflamatória (Kanji e Das, 2017). Durante a inflamação, forma-se uma crosta, enquanto neutrófilos e macrófagos infiltram a área da lesão. Essas células atuam no combate a infecções e na remoção de detritos celulares. Os macrófagos, em particular, liberam citocinas que estimulam a migração de fibroblastos e queratinócitos, que são cruciais para a regeneração do tecido (Wang *et al.*, 2022).

Na fase proliferativa, os fibroblastos iniciam a formação da matriz extracelular, além de promover a angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos. Eles também sintetizam colágeno, que fornece um suporte estrutural temporário ao tecido em reparação. Simultaneamente, ocorre a reativação do tecido epitelial, através de um processo conhecido como reepitelização, que restaura a camada de células epiteliais e contribui para o fechamento da ferida (Mony *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2019). Por fim, na fase de remodelação, o colágeno imaturo, predominantemente do tipo III, é substituído por colágeno tipo I, que é mais resistente. Durante essa fase, há uma inativação dos fibroblastos e queratinócitos, além da regressão dos vasos sanguíneos (Mony *et al.*, 2023). Este processo de maturação pode durar meses, resultando em um tecido cicatrizado que, embora não atinja a resistência total da pele original, apresenta significativa melhora na força e elasticidade (Gurtner *et al.*, 2008).

Figura 1 - Processo de cicatrização espontânea da ferida



Fonte: Adaptado de (Ryall *et al.*, 2022)

Essas quatro fases interdependentes garantem que o processo de cicatrização ocorra de maneira coordenada, permitindo que o tecido ferido recupere sua função e integridade estrutural de forma eficaz. No entanto, o sucesso da cicatrização de feridas depende de uma série de fatores sistêmicos e locais. A presença de comorbidades, como diabetes e doenças que afetam a cicatrização, além de fatores como desnutrição, infecções e a presença de corpos estranhos, pode interferir nessa dinâmica (Beyene, Derryberry e Barbul, 2020). Fatores locais, como oxigenação, infecção, insuficiência venosa e isquemia, juntamente com fatores sistêmicos, como idade, gênero, hormônios sexuais, estresse, obesidade, uso de medicamentos (como esteroides glicocorticoides e anti-inflamatórios não esteroides), alcoolismo, tabagismo e condições imunocomprometidas, também impactam significativamente a cicatrização (Deng *et al.*, 2021; Guo e Dipietro, 2010).

A cicatrização geralmente leva um período de 4 a 6 semanas (Wallace, Basehore e Zito, 2024). A eficiência desse reparo não se limita à recuperação física, uma vez que complicações como feridas crônicas, que são aquelas que não cicatrizam em até 6 semanas, podem impactar profundamente a autoestima e a qualidade de vida dos pacientes, além de aumentar o risco de infecções secundárias (Kapp, Miller e Santamaria, 2018; Wallace, Basehore e Zito, 2024).

Em casos de feridas agudas tardias e feridas crônicas, que geralmente não conseguem progredir pelos estágios normais de cicatrização, há uma interrupção da cicatrização na fase inflamatória, que pode se prolongar além do tempo considerado normal. Essa inflamação persistente resulta em desequilíbrios nas citocinas, cuja presença deveria ser temporária, o que leva a uma degradação excessiva dos fatores de crescimento e dos receptores da matriz extracelular. Como consequência, é necessário manter uma resposta imunológica constante, gerando um ciclo inflamatório que prejudica a cicatrização (Xue *et al.*, 2018).

Sabe-se que, em feridas crônicas, ocorre um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que intensifica o estresse oxidativo na lesão. Embora se observe uma maior expressão de antioxidantes enzimáticos na ferida, a superprodução de ERO resulta na inativação desses antioxidantes epidérmicos, contribuindo para dificultar a cicatrização (Seyed Ahmadi, Farahpour e Hamishehkar, 2019; Soneja, Drews e Malinski, 2005). Esse desequilíbrio no ambiente oxidativo torna a ferida mais suscetível a infecções, uma das principais causas de complicações no processo de cicatrização (Yazarlu *et al.*, 2021). Com as células do sistema imunológico sob estresse, sua capacidade de combater patógenos é comprometida, facilitando a invasão por bactérias como *Staphylococcus aureus*, que podem formar biofilmes resistentes aos tratamentos, dificultando ainda mais o processo de cura (Ryall *et al.*, 2022; Yi *et al.*, 2020).

O uso de medicamentos tópicos para cicatrização de feridas apresenta vantagens em relação à via sistêmica. Enquanto a via sistêmica depende de uma perfusão sanguínea adequada no tecido-alvo, o que nem sempre é possível em

feridas crônicas, a entrega tópica de medicamentos permite um direcionamento mais eficaz. Feridas crônicas, muitas vezes, carecem de uma oferta sanguínea crítica, e a entrega sistêmica pode acarretar efeitos colaterais nos tecidos não-alvo, limitando a dosagem e a duração do tratamento. Essas limitações têm impulsionado o crescente foco na entrega tópica de medicamentos (Whittam *et al.*, 2016).

Embora a via tópica apresente vantagens, como melhor biodisponibilidade e redução de toxicidade sistêmica, ela ainda enfrenta desafios considerando as abordagens tradicionais. Um exemplo é a dificuldade de penetração do estrato córneo da pele em risco de ulceração, além da necessidade de garantir a viabilidade celular após a entrega dos agentes terapêuticos (Whittam *et al.*, 2016). Outro desafio são as formulações tópicas tradicionais, como as à base de prata, que podem danificar os tecidos saudáveis ao redor da ferida. Essas formulações apresentam citotoxicidade, comprometendo a viabilidade celular e retardando a cicatrização (Kaiser, Wächter e Windbergs, 2021; Nethi *et al.*, 2019; Prakashan, Roberts e Gandhi, 2023). A formação de biofilme em feridas crônicas também dificulta a penetração dos agentes terapêuticos e protege as bactérias dos antimicrobianos. Além disso, o uso de antibióticos tópicos pode contribuir para o aumento da resistência bacteriana e causar efeitos adversos, como reações de hipersensibilidade tardias, superinfecções e dermatite de contato (Kaiser, Wächter e Windbergs, 2021).

A dificuldade em desenvolver terapias eficazes é evidenciada pelo fato de que, após a aprovação do gel de becaplermina (Regranex™) pelo Food and Drug Administration (FDA) há mais de 25 anos, nenhuma nova terapia avançou para aplicações clínicas. De acordo com a análise de Chen e colaboradores (2023), isso ocorre porque, ao contrário do câncer, onde uma única molécula pode ser eficaz, a cicatrização de feridas demanda abordagens mais complexas, que envolvam múltiplas vias celulares, algo que não pode ser alcançado por uma única molécula (Chen *et al.*, 2023).

Diante dos desafios presentes no tratamento de feridas, os produtos naturais emergem como alternativas promissoras. Sua composição complexa e propriedades multifuncionais — como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante — permitem que atuem de forma sinérgica em diferentes fases do processo de cicatrização (Sychrová *et al.*, 2020). Essas características podem contribuir para uma abordagem terapêutica mais eficaz, potencialmente reduzindo riscos associados aos tratamentos convencionais, como a toxicidade e a resistência bacteriana. Com o avanço na compreensão dos mecanismos de cicatrização e o desenvolvimento de novas tecnologias de formulação, substâncias naturais têm mostrado potencial para acelerar a cicatrização, oferecendo maior biocompatibilidade e impacto ambiental reduzido (Yazarlu *et al.*, 2021). Embora os tratamentos convencionais ainda desempenhem um papel essencial, a exploração de alternativas naturais representa uma abordagem inovadora e sustentável, capaz de enfrentar esse crescente desafio de saúde pública.

2.2 PRODUTOS NATURAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

No Brasil, a vasta biodiversidade, com mais de 50.000 espécies de plantas superiores, destaca o enorme potencial do país como uma fonte rica de compostos bioativos promissores para o desenvolvimento de novas terapias (Calixto, 2019; Liu e Chen, 2024). Produtos naturais são definidos como compostos químicos provenientes de fontes biológicas, como plantas, animais, minerais e matéria orgânica, que possuem propriedades terapêuticas amplamente valorizadas por suas ações anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes (Bernardini *et al.*, 2018; Farnsworth, 1990; Monika *et al.*, 2021). Esses compostos são utilizados de diferentes formas: como fontes diretas de agentes terapêuticos, matéria-prima para fármacos semissintéticos, protótipos para o *design* de moléculas, e como marcadores taxonômicos para a descoberta de novos medicamentos (Calixto, 2019).

O crescente interesse por produtos naturais em formulações farmacêuticas pode ser atribuído a vários fatores. Em primeiro lugar, há uma demanda por terapias que apresentem menos efeitos adversos e menor toxicidade em comparação com medicamentos sintéticos (Wright, 2019). Em segundo lugar, a crescente resistência antimicrobiana tem impulsionado a busca por alternativas aos antibióticos convencionais. Muitos compostos naturais demonstram atividade antimicrobiana promissora, inclusive contra bactérias resistentes, além de exibirem potencial sinérgico quando combinados com antibióticos (Álvarez-Martínez, Barraón-Catalán e Micol, 2020). Por fim, existe uma preferência por terapias que ofereçam uma abordagem multifuncional, visto que muitos agentes naturais possuem propriedades combinadas, como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. Essa versatilidade pode melhorar a eficácia geral do tratamento, promovendo uma melhor adesão dos pacientes, reduzindo efeitos colaterais e ampliando o espectro de ação (Sychrová *et al.*, 2020).

Produtos naturais, como flavonoides, terpenoides e taninos, apresentam propriedades biológicas promissoras para a cicatrização de feridas, incluindo a modulação das fases inflamatória e proliferativa, o que acelera o processo de reparo cutâneo, promove a regeneração tecidual e minimiza cicatrizes indesejadas (Frydman *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2011; Natarajan *et al.*, 2013; Ranzato, Martinotti e Burlando, 2013; Su *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2013). A fitoterapia, uma prática milenar, reafirma sua relevância na medicina moderna ao oferecer fitomedicamentos que demonstram eficácia na aceleração da cicatrização e na prevenção de infecções, inclusive através da ação anti-inflamatória e proteção contra biofilmes bacterianos, essenciais no tratamento de feridas de difícil cicatrização (Criollo-Mendoza *et al.*, 2023; Ryall *et al.*, 2022).

Apesar desse potencial terapêutico, a aplicação de produtos naturais enfrenta desafios significativos, como a estabilização química, a padronização de composição, a definição de doses seguras e eficazes e solubilidade limitada (Criollo-Mendoza *et al.*, 2023; Mouro e Gouveia, 2024). Para contornar essas limitações, tecnologias modernas como microagulhas, vesículas lipídicas, hidrogéis

e curativos combinados vêm sendo aplicadas, visando otimizar a administração e aumentar a eficácia de compostos naturais (Ryall *et al.*, 2022). Superar esses desafios é essencial para garantir maior estabilidade e consistência desses agentes, promovendo sua aplicação segura e eficaz no tratamento de feridas (Mouro e Gouveia, 2024).

Embora apresentem esses desafios, os produtos naturais, em particular os óleos essenciais, emergem como uma alternativa promissora devido ao seu amplo espectro de atividades terapêuticas. Os óleos essenciais são compostos voláteis e aromáticos extraídos de plantas, representando o maior grupo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Eles são compostos por uma complexa mistura de monoterpenos (10 carbonos) e, em menor proporção, sesquiterpenos (15 carbonos). A extração dos óleos essenciais ocorre geralmente por destilação com água ou vapor e, no caso de frutas cítricas, por prensagem a frio. Devido à sua ampla aplicação em cosméticos, fragrâncias e alimentos, a composição química e os efeitos dos óleos essenciais na pele vêm sendo exaustivamente estudados há décadas. Com uma longa história de uso na medicina tradicional, esses óleos têm mostrado potencial significativo no tratamento de feridas, atuando em áreas como controle de infecções, redução da inflamação e regeneração tecidual (Pérez-Recalde, Ruiz Arias e Hermida, 2018).

Estudos recentes reforçam a eficácia dos óleos essenciais, destacando suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Lee *et al.*, 2007; Alves-Silva *et al.*, 2023; Alam *et al.*, 2017). Um exemplo é o óleo essencial de cipreste japonês (*Chamaecyparis obtusa*), que contém os compostos nerolidol e eugenol. O eugenol, principal composto fenólico do óleo de cravo, é amplamente utilizado na odontologia como selante de canal radicular, além de apresentar propriedades antibacterianas e antifúngicas. O nerolidol, um sesquiterpeno conhecido por promover a penetração cutânea de medicamentos, também possui atividade antibacteriana. No estudo de Lee *et al.* (2007), esses compostos foram isolados do óleo essencial de cipreste e avaliados quanto à ação antifúngica em modelo animal, após aplicação tópica. Embora o nerolidol tenha demonstrado menor

potência antifúngica contra *Microsporum gypseum* em comparação ao eugenol, foi mais eficaz na melhora das lesões cutâneas infectadas na primeira semana de tratamento. Animais tratados apresentaram menor grau de hiperqueratose e infiltração de células inflamatórias, além de remissão significativa das lesões. Os autores sugerem que propriedades complementares, como atividades antibacterianas e anti-inflamatórias, também contribuíram para os resultados observados (Lee *et al.*, 2007).

Outro exemplo relevante é o óleo essencial de *Salvia aurea* L., uma planta utilizada tradicionalmente como um antisséptico tópico para o tratamento de feridas, destacando o potencial de óleos essenciais neste campo. No estudo de Alves-Silva e colaboradores (2023), o óleo essencial de sálvia apresentou os seguintes compostos majoritários: (E)-cariofileno, 1,8-cineol, β -pineno, cis-tujona e cânfora. Suas propriedades cicatrizantes foram avaliadas no modelo de ferida por *scratch* em fibroblastos NIH 3T3, na concentração de 1,25 μ L/mL. O óleo promoveu a migração celular sem comprometer a viabilidade das células. Os autores sugerem que esse efeito pode ser atribuído ao efeito sinérgico dos compostos presentes no óleo. Adicionalmente, o óleo demonstrou atividade antifúngica contra dermatófitos associados a micoses superficiais e lesões cutâneas. Também foi observado efeito anti-inflamatório, com redução significativa na liberação de óxido nítrico (NO) e nos níveis das proteínas COX-2 e iNOS (Alves-Silva *et al.*, 2023).

Por fim, o óleo essencial de cravo, obtido dos botões florais de *Syzygium aromaticum* (ou *Eugenia caryophyllata*, Myrtaceae), também demonstra grande potencial terapêutico, especialmente pelo eugenol, seu principal componente, conhecido por atividades antioxidantes e anticancerígenas. Alam *et al.* (2017) encapsularam o óleo de cravo em uma nanoemulsão para investigar sua eficácia na cicatrização de feridas em camundongos via administração oral. Preparada pelo método de emulsificação espontânea e diagramas de fase, a nanoemulsão foi formulada com 1% de óleo essencial, 8% de Triacetina, 15% de Tween-80 e 15% de Labrasol, resultando em partículas com diâmetro médio de 29,10 nm e Pdl de 0,026. O estudo mostrou que a nanoemulsão proporcionou uma cicatrização superior em

roedores em relação ao óleo essencial puro, justificando a importância da incorporação de óleos essenciais em sistemas avançados para potencializar sua eficácia. Além disso, a nanoemulsão mostrou aumento no conteúdo de colágeno e ausência de células inflamatórias, indicando segurança e ausência de toxicidade (Alam *et al.*, 2017).

Esses estudos ressaltam a versatilidade dos óleos essenciais como alternativas promissoras para o tratamento de feridas. Embora tenham sido apresentados exemplos de plantas de outras regiões do mundo, que demonstraram eficácia comprovada, é fundamental reconhecer que a biodiversidade brasileira abriga uma ampla gama de espécies ainda pouco investigadas, especialmente aquelas que não são tradicionalmente reconhecidas por suas propriedades terapêuticas. Essa lacuna representa uma oportunidade significativa para a pesquisa de novas fontes de compostos bioativos, que podem revelar propriedades únicas e inovadoras. Assim como os terpenoides presentes nas plantas estrangeiras mencionadas, diversas espécies nativas do Brasil também contêm esses compostos, merecendo, portanto, uma investigação mais aprofundada. Um exemplo promissor é *Baccharis dracunculifolia*, cujos compostos bioativos demonstram grande potencial para as aplicações na cicatrização de feridas, reforçando a importância de explorar e valorizar a flora brasileira no contexto da saúde e da medicina natural.

2.3 *Baccharis dracunculifolia*

Dentro do cenário de produtos naturais que promovem a cicatrização de feridas, *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como “alecrim-do-campo” ou “vassourinha” (Figura 2), se destaca como uma opção promissora. Esse arbusto é nativo do Brasil e pode ser encontrado desde o sudeste até o sul do país, assim como em outros países da América do Sul (Barroso, 1976; Paroul *et al.*, 2016). Pertence à família *Asteraceae*, uma das maiores famílias de plantas com flores, engloba mais de 1.600 gêneros e cerca de 25.000 espécies

(Gazim *et al.*, 2022). Diversas espécies do gênero *Baccharis* têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional para tratar uma série de condições, tais como febre, inflamação, problemas cardiovasculares, distúrbios gástricos, gripes e feridas cutâneas, comumente utilizando-se de partes do vegetal como folhas, caule, ramos e flores, que apresentam propriedades terapêuticas atribuídas principalmente aos seus compostos bioativos (Feresin *et al.*, 2003; Verdi, Brighente e Pizzolatti, 2005).

Figura 2 - Espécime adulto (A), folhas (B) e flores (C) de *B. dracunculifolia*



Fonte: Gazim e colaboradores, 2022.

Além das propriedades medicinais, *B. dracunculifolia* também é notável por outras contribuições. Seu tamanho e a resistência de sua madeira fazem com que seja um recurso valorizado em várias regiões do Brasil (Gazim *et al.*, 2022). O arbusto é utilizado na produção de utensílios domésticos, inclusive é associado ao termo "vassourinha" devido ao seu uso na confecção de vassouras rústicas para retirar as cinzas dos fornos de barro utilizados na preparação de pães e bolos. A proximidade com o calor durante esse processo faz com que as folhas verdes liberem o suave aroma do alecrim-do-campo no ar, conferindo um sabor sutil e agradável aos assados.

No campo ecológico, *B. dracunculifolia* exerce uma função importante,

atraindo insetos polinizadores essenciais para a manutenção dos ecossistemas (Fernandes *et al.*, 2018). É reconhecida também como a principal fonte vegetal para a obtenção da própolis verde brasileira, produzida no estado de Minas Gerais e renomada internacionalmente por sua qualidade (Lemos *et al.*, 2010; Moise e Bobiş, 2020; Paulino *et al.*, 2009). Além disso, a importância ecológica de *B. dracunculifolia* estende-se além de seu valor apícola. Esta espécie desempenha um papel relevante no apoio ao crescimento de outras plantas ao seu redor, assim como na restauração de áreas degradadas devido ao seu rápido desenvolvimento vegetativo (Gazim *et al.*, 2022). Esse efeito positivo foi observado em locais onde a espécie foi introduzida, trazendo melhorias notáveis nas condições ambientais, incluindo temperatura, umidade e a disponibilidade de matéria orgânica no solo (Siqueira *et al.*, 2022). Outro aspecto interessante é sua aplicação na biorremediação de solos contaminados por metais pesados. A planta é frequentemente encontrada em zonas de recuperação ambiental no Cerrado e na Mata Atlântica, contribuindo para a revitalização desses ecossistemas (Gomes *et al.*, 2015). Com esses diversos benefícios, *B. dracunculifolia* demonstra ser importante no apoio à biodiversidade e à saúde dos ecossistemas.

Estudos publicados na literatura confirmam as diversas atividades biológicas dos extratos provenientes das folhas de *B. dracunculifolia*, como a ação antioxidante, anti-inflamatória, antiúlcera, citotóxica e antimicrobiana (Costa *et al.*, 2019; Fabri *et al.*, 2011; Santos, dos *et al.*, 2010). Embora o foco deste estudo seja o óleo essencial de *B. dracunculifolia* (BDO), também obtido das folhas e flores da planta, é relevante destacar que esses extratos apresentam propriedades importantes que corroboram a escolha da planta como objeto de investigação.

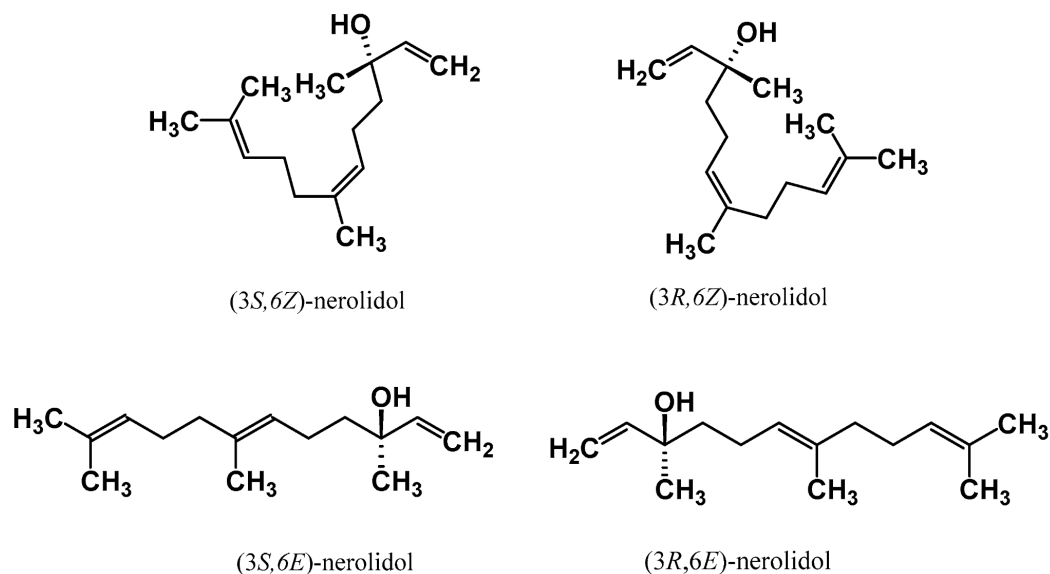
O BDO, caracterizado pelo seu odor típico de mel, é composto majoritariamente de terpenóides como sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos, principalmente nerolidol, espatulenol, germacreno D, limoneno, β -cariofileno e biciclogermacreno. Esses compostos estão relacionados com a importante atividade anti-inflamatória e antiproliferativa observada (Brandenburg, 2020; Cazella *et al.*, 2019; Quintino *et al.*, 2020). O BDO apresenta atividades antibacterianas contra *Mycobacterium* sp., *Streptococcus mutans*, *P. aeruginosa*,

Bacillus cereus e *S. aureus*, e antifúngicas contra *Candida albicans* e *Fusarium graminearum* (Cazella *et al.*, 2019; Ferronato *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2011).

No estudo conduzido por Brandenburg (2020), o BDO foi avaliado quanto à sua aplicação tópica em camundongos submetidos a inflamação cutânea aguda e crônica, induzida por ácido araquidônico ou pelo composto 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Os resultados revelaram a capacidade do óleo em modular diversos aspectos do processo inflamatório, com eficácia comparável ao corticoide dexametasona na reversão do estado inflamatório. Os autores sugeriram que as propriedades anti-inflamatórias e antiproliferativas observadas podem ser atribuídas à presença de sesquiterpenos neste óleo (Brandenburg, 2020).

Entre os constituintes sesquiterpênicos identificados no BDO destaca-se o nerolidol, que possui quatro formas isoméricas diferentes (Figura 3), reconhecido como um dos principais componentes (Chan *et al.*, 2016; Russo, 2011). Este composto demonstrou possuir propriedades sedativas e é encontrado em níveis discretos em cascas de frutas cítricas, incluindo laranjas. Entre as suas atividades farmacológicas e biológicas ressalta-se também a sua ação antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante, ansiolítica, antiparasitária, repelente de insetos, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiulcerogênica e anticâncer (Barros Silva Soares de Souza *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2016).

Figura 3 - Estruturas químicas dos dois enantiômeros para isômeros *cis* e *trans* do nerolidol.



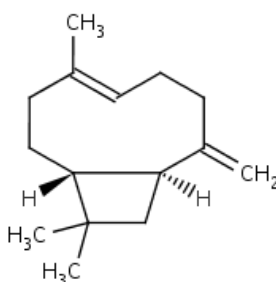
Fonte: Chan e colaboradores, 2016.

Além das propriedades farmacológicas, foi observado que ele é capaz de aumentar a penetração do 5-fluorouracil na pele, conforme explorado por Cornwell e Barry (1994). Tem capacidade de se alinhar eficientemente nas lamelas lipídicas do estrato córneo, resultando na perturbação de sua organização (Chan *et al.*, 2016; Cornwell e Barry, 1994). Além disso, é importante ressaltar que o nerolidol não apresentou toxicidade quando administrado a 4% em humanos, por meio de uma aplicação oclusiva durante 48 horas, nem apresentou propriedades sensibilizantes em testes de maximização ou em testes de contato de insulto repetido (Lapczynski *et al.*, 2008).

Ademais, o β -cariofileno (Figura 4), um sesquiterpeno bicíclico presente no BDO e também em outras plantas, como a *Cannabis sativa* L., possui uma ampla atividade biológica, incluindo antioxidante, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante (Dahham *et al.*, 2015; Gushiken *et al.*, 2022). O β -cariofileno foi avaliado *in vivo* quanto à capacidade de cicatrização de feridas na pele, apresentando poder cicatrizante significativo em comparação com três

medicamentos amplamente utilizados na prática clínica, que foram o sulfato de neomicina (5 mg/g) + bacitracina-zinco (250 IU/g), dexpanthenol 5% e collagenase 1,2 IU, sem mostrar toxicidade sistêmica (Gushiken *et al.*, 2022). Por ser um fitocanabinoide, o β -cariofileno pode atuar como um agonista do receptor canabinoide tipo 2 (CB2), que está relacionado à inibição da inflamação e formação de edema, além de apresentar efeitos analgésicos (Baldissera *et al.*, 2017; Basha e Sankaranarayanan, 2016; Gertsch *et al.*, 2008). Devido à ausência de efeitos psicoativos associados aos agonistas dos receptores CB2, o β -cariofileno surge como uma perspectiva promissora enquanto substância terapêutica, tanto para seu uso sistêmico quanto para aplicações tópicas (Karsak *et al.*, 2007).

Figura 4 - Estrutura química do β -cariofileno



Fonte: ChEBI (2021).

Um desafio significativo para o uso de *B. dracunculifolia* no desenvolvimento de agentes terapêuticos tópicos é a instabilidade dos compostos bioativos presentes, como o *t*-nerolidol e o β -cariofileno. Devido à sua natureza hidrofóbica, volatilidade e suscetibilidade à degradação, especialmente em formulações aquosas para a pele, esses compostos podem perder eficácia ao longo do tempo (Azzi *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2016; Di Giacomo *et al.*, 2017). O nerolidol, por exemplo, é altamente suscetível à fotodegradação devido às suas ligações duplas, enquanto o β -cariofileno pode oxidar quando exposto ao ar, formando produtos alergênicos, como o óxido de cariofileno (Sköld *et al.*, 2006).

Esses desafios ressaltam a importância de estratégias para aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade desses compostos em formulações tópicas. Uma

dessas estratégias é o uso de nanotecnologia, como as nanoemulsões, que podem proteger os compostos bioativos e melhorar sua entrega na pele, oferecendo uma solução promissora para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

2.4 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões emergem como sistemas inovadores e promissores para a entrega de óleos essenciais, especialmente no contexto de suas aplicações terapêuticas. A natureza hidrofóbica e volátil dos óleos essenciais, como os compostos encontrados no BDO, muitas vezes resulta em instabilidade e baixa solubilidade em formulações aquosas, comprometendo sua eficácia. Nesse cenário, as nanoemulsões oferecem uma solução eficaz ao incorporar esses óleos em uma matriz emulsionada, o que não apenas melhora a estabilidade, mas também a biodisponibilidade dos princípios ativos, reduz a volatilidade e a toxicidade (Cimino *et al.*, 2021; Pavoni *et al.*, 2020).

Uma emulsão é definida como uma combinação de dois ou mais líquidos que não se misturam naturalmente, na qual a fase dispersa, composta por gotículas, se encontra dispersa de maneira homogênea em toda a fase contínua. Este sistema possui como característica típica o aspecto leitoso e é classificado como um sistema coloidal (Naseema *et al.*, 2021). As nanoemulsões, por sua vez, se distinguem por sua escala nanométrica, apresentando uma aparência transparente ou translúcida, com o diâmetro das gotículas variando entre 20 e 200 nanômetros (Barradas e Holanda e Silva, de, 2021; Tadros *et al.*, 2004). Essas nanoemulsões são sistemas coloidais termodinamicamente instáveis, constituídas por duas fases imiscíveis de óleo e água, estabilizadas por uma camada interfacial de surfactante, que desempenha um papel crucial na diminuição da tensão interfacial (Barradas e Holanda e Silva, de, 2021).

O processo de estabilização das nanoemulsões reduz a energia de cisalhamento necessária para diminuir o raio de curvatura das gotículas formadas

(Leong *et al.*, 2009). A escolha do surfactante é determinante, influenciando diretamente propriedades essenciais da nanoemulsão, como o diâmetro das gotículas, a estabilidade do sistema e sua biocompatibilidade, aspectos que são fundamentais para a eficácia e segurança das formulações (Azeem, Rizwan, Ahmad, F., *et al.*, 2009). Os surfactantes utilizados em nanoemulsões podem ser classificados em diferentes categorias, como iônicos (catiônicos e aniônicos) e não iônicos, sendo estes amplamente preferidos devido à sua menor toxicidade e maior biocompatibilidade, características essenciais para aplicações cosméticas e farmacêuticas (Hoeller, Sperger e Valenta, 2009).

Surfactantes não iônicos, como os ésteres de polioxietileno (polissorbatos), ésteres de poliol (como os ésteres de ácido graxo de sorbitano), e poloxâmeros (por exemplo, polaxâmero 188), são amplamente utilizados em nanoemulsões devido à sua capacidade de formar sistemas estáveis (Cortés *et al.*, 2021; Tadros, 2013). Além disso, a escolha de um surfactante não iônico adequado garante a estabilidade física a longo prazo da nanoemulsão, prevenindo a coalescência das gotículas e mantendo a integridade do sistema ao longo do tempo (Lawrence e Rees, 2000). Apesar das vantagens dos surfactantes não iônicos na estabilização de nanoemulsões, esses compostos podem apresentar diversas limitações que podem comprometer a eficácia e a segurança das formulações. Um dos principais problemas dos polietilenoglicóis (PEG) é a toxicidade e irritação que podem causar, especialmente em aplicações tópicas (Bruusgaard-Mouritsen, Johansen e Garvey, 2021; Lémery *et al.*, 2015; Zesch, 1988).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos surfactantes têm se concentrado em melhorar a segurança e a biodegradabilidade das formulações, especialmente em aplicações farmacêuticas e cosméticas (Cedrola *et al.*, 2024; De *et al.*, 2015; Saxena e Mandal, 2022). Essa mudança de paradigma reflete a crescente demanda por sustentabilidade, buscando reduzir o impacto ambiental e atender ao interesse dos consumidores por produtos mais seguros e ecologicamente corretos. Em particular, há um movimento em direção a formulações sem PEG, que são mais alinhadas com essas expectativas (Nagtode *et al.*, 2023).

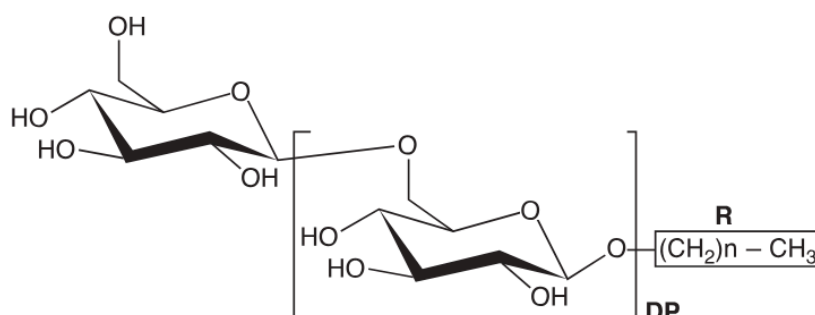
Surfactantes de origem natural, como os alquil poliglucosídeos (APG), vêm ganhando destaque por sua alta biocompatibilidade, segurança e sustentabilidade ambiental (Pantelic e Cuckovic, 2014). Derivados de açúcares e álcoois graxos, os APG são surfactantes não iônicos eficazes na formação de nanoemulsões estáveis, tornando-se uma alternativa promissora aos surfactantes sintéticos tradicionais (Mohamad Shahripoddin, Salim e Ahmad, 2021). Compostos por uma porção sacarídica hidrofílica e uma cadeia alquila hidrofóbica, são obtidos de fontes naturais como óleo de coco/palmiste e glicose de milho, o que lhes confere um excelente perfil ecotoxicológico e alta biodegradabilidade (Geetha e Tyagi, 2012; Johnson *et al.*, 2021). Devido às suas propriedades de umectação, redução da tensão superficial, tolerância a eletrólitos, eles são amplamente utilizados em diversas aplicações, incluindo detergentes, emulsificantes cosméticos e agentes farmacêuticos (El-Sukkary *et al.*, 2008; Geetha e Tyagi, 2012). Além de serem compatíveis com formulações livres de sulfatos e PEG, características valorizadas em cosméticos eco-friendly (Rastogi, 2021; Rybinski, von e Hill, 1998).

Entre os APG, o coco-glicosídeo (glicosídeo de álcool graxo C8-16) se destaca como surfactante primário ou cosurfactante em produtos de limpeza cosmética, devido à sua segurança ocular e dermatológica, além de suas propriedades espumantes, baixa penetração nas camadas epidérmicas e dérmicas, boa biodegradabilidade, molhabilidade, segurança e capacidade de limpeza (Keck *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2020; Pantelic e Cuckovic, 2014; Savic *et al.*, 2014). Dessa forma, os APG, como o coco-glucosídeo, emergem como alternativas viáveis e seguras em formulações livres de sulfatos e PEG, reforçando seu papel em produtos ecologicamente responsáveis.

A estrutura molecular dos APG, com um grupo polar de glicose e um grupo não polar de álcoois graxos (Figura 5), permite a criação de uma barreira estérica que previne a coalescência, aumentando a estabilidade das formulações (Oliveira e Mei, 2009). A versatilidade dos APG na formulação de nanoemulsões, é especialmente relevante considerando os métodos de obtenção dessas emulsões, cujo sucesso depende da escolha adequada dos surfactantes e da técnica utilizada

para gerar gotículas de diâmetro nanométrico. Métodos como homogeneização de alta pressão, inversão de fase, microfluidização e ultrassonicação são empregados para a obtenção de nanoemulsões, sendo a ultrassonicação uma das mais eficazes em pequena escala (Naseema *et al.*, 2021). O processo funciona por meio da agitação molecular causada pelas ondas sonoras, promovendo a dispersão da fase oleosa na fase aquosa e a quebra das gotículas em diâmetros submícronicos, o que contribui diretamente para a estabilidade do sistema (Li e Fogler, 1978).

Figura 5 - Estrutura molecular dos APG



R = grupo alquil, DP = número médio de unidades de glicose

Fonte: Adaptado de Savic (2014)

As nanoemulsões têm se destacado como uma alternativa promissora para a encapsulação de óleos essenciais, oferecendo uma série de vantagens em comparação com emulsões convencionais. Esses sistemas podem ser aplicados em diversas formas farmacêuticas, como líquidos, sprays, cremes, géis, aerossóis e espumas (Singh *et al.*, 2017). Entre as principais propriedades das nanoemulsões, destacam-se: o aprimoramento da estabilidade da formulação, resultando em maior vida útil; o aumento na solubilidade de ativos pouco solúveis em formulações aquosas; e uma área superficial ampliada para o ativo, o que otimiza sua biodisponibilidade. Além disso, as nanoemulsões têm a capacidade de dispersar fracamente a luz, conferindo transparência à formulação, e apresentam fluidez elevada, facilitando a dispersão eficaz sobre a pele. Esses sistemas também

possibilitam o controle da liberação de compostos bioativos, além de melhorar as propriedades sensoriais da formulação (Choi e McClements, 2020; Fuentes *et al.*, 2021; Naseema *et al.*, 2021).

As nanoemulsões são especialmente úteis no tratamento de feridas difíceis de cicatrizar, pois superam as limitações das terapias tradicionais. Tratamentos convencionais com antibióticos, antimicrobianos e medicamentos tópicos, por exemplo, apresentam baixa penetração em camadas mais profundas da pele e risco de resistência bacteriana quando usados prolongadamente (Gao *et al.*, 2018). Diante desses desafios, as nanoemulsões e outras estratégias nanotecnológicas se destacam por proporcionar uma liberação controlada e constante dos ativos em concentrações ideais, o que melhora a biodisponibilidade e o perfil farmacocinético, reduzindo a necessidade de reaplicações (Kolimi *et al.*, 2022; McClements e Jafari, 2018; Mofazzal Jahromi *et al.*, 2018).

A estrutura das nanoemulsões, com gotículas menores, aumenta a área de contato dos princípios ativos sobre a ferida. Isso facilita a interação com as células locais, promovendo um efeito sinérgico dos compostos aplicados e resultando em uma ação mais eficaz (Chhabra *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2016). Além disso, ao evitar o metabolismo de primeira passagem, essas formulações minimizam efeitos adversos comuns na terapia oral, promovendo maior adesão ao tratamento (Chhabra *et al.*, 2023; Puglia *et al.*, 2010).

O potencial das nanoemulsões como veículos eficazes para agentes de cicatrização de feridas foi demonstrado em estudos. Um exemplo é o trabalho de Parisotto-Peterle *et al.* (2020), que desenvolveu uma nanoemulsão de β -cariofileno, e um hidrogel contendo essa nanoemulsão, avaliando o perfil de permeação *in vitro* e a atividade cicatrizante *in vivo* (Parisotto-Peterle *et al.*, 2020).

A nanoemulsão foi composta por uma fase oleosa contendo 10,0% (m/m) de β -cariofileno e 1,0% (m/m) Span 80®, além de uma fase aquosa composta por 1,0% (m/m) de Tween 20® e água purificada. Essa formulação foi obtida por homogeneização de alta pressão, enquanto o hidrogel foi formulado através de

dispersão direta com 1,5% (m/m) de hidroxietilcelulose. Ambas as formulações foram caracterizadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), analisando o diâmetro das gotas, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (PZ) (Parisotto-Peterle *et al.*, 2020).

Os resultados mostraram que as formulações apresentaram diâmetro de gota próximo de 280 nm, Pdl inferior a 0,2, PZ negativo em torno de -30 mV e um elevado teor de β -cariofileno (entre 72 e 80%), mantendo a estabilidade por até 60 dias. A permeação cutânea, avaliada em células de Franz com pele de orelha de porco, revelou que o β -cariofileno isolado não conseguiu atravessar o estrato córneo, enquanto a nanoemulsificação facilitou essa permeação. Em modelos de ferida dorsal em roedores, observou-se que o tratamento com o hidrogel contendo a nanoemulsão resultou em um fechamento mais rápido da ferida, evidenciado pela redução da área de superfície e pela contração da ferida, destacando seu efeito anti-inflamatório. A análise histológica realizada no 12º dia pós-lesão indicou que o hidrogel apresentou resultados comparáveis aos do grupo controle positivo (Dersani®), demonstrando sua eficácia no reparo do tecido cutâneo. Além disso, foi observado que a aplicação direta de β -cariofileno nas feridas causava irritação, o que não ocorreu quando o hidrogel foi utilizado, indicando sua capacidade de reduzir a irritação da pele (Parisotto-Peterle *et al.*, 2020).

A administração tópica de nanoemulsões também permite a difusão de ativos terapêuticos através dos apêndices cutâneos, como folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas, que representam rupturas na continuidade do estrato córneo. Essas estruturas oferecem uma via adicional para a entrega de compostos bioativos diretamente nas camadas mais profundas da pele. Esse mecanismo é especialmente útil no tratamento de feridas superficiais, como arranhões, raspagens ou cortes, que danificam a epiderme e parte da derme subjacente, mas preservam os folículos capilares e as glândulas sudoríparas intactos (Bornes *et al.*, 2021; Kakadia e Conway, 2022).

O diâmetro das partículas influencia a penetração nos folículos, pois partículas menores alcançam maiores profundidades, enquanto partículas maiores

têm alcance limitado. O acúmulo de substâncias no folículo pode proporcionar uma liberação contínua e controlada do ativo ao longo do tempo (Liu *et al.*, 2023). Os folículos alcançam uma profundidade de até 1000 μm na derme, criando uma superfície tridimensional de contato com a pele, oferecendo uma área ampla o suficiente para garantir a absorção eficaz de substâncias que promovem a regeneração e reparo da pele (Zhou *et al.*, 2021).

Um exemplo prático do uso dessa via de entrega foi demonstrado na pesquisa de Dahmana *et al.* (2021), que investigou nanomicelas poliméricas para liberar espironolactona, um antagonista do receptor mineralocorticoide que evita a ligação de glicocorticoides e, assim, potencialmente acelera a cicatrização. Desenvolvido especificamente para otimizar a recuperação de feridas de cicatrização lenta e tratar condições cutâneas relacionadas a andrógenos, o sistema encapsulou espironolactona em nanomicelas com um copolímero derivado do poli(etileno glicol) e do ácido poli(láctico) (mPEG-dihexPLA), resultando em partículas com diâmetro médio de 21 nm e Pdl de 0,2, caracterizados por DLS. A avaliação da penetração folicular, realizada em pele suína utilizando células de difusão de Franz, evidenciou que a deposição de espironolactona foi cinco vezes maior nas áreas com unidades pilossebáceas (PSU) em comparação com amostras sem essas estruturas. Esse direcionamento efetivo aos folículos pilosos reforça o papel dessas estruturas como vias promissoras para melhorar a eficácia dos tratamentos tópicos, especialmente para cicatrização de feridas (Dahmana *et al.*, 2021). Nesse contexto, os folículos pilosos desempenham um papel importante na melhoria da absorção dos ativos, oferecendo uma via significativa para a entrega eficaz de tratamentos tópicos (Kakadia e Conway, 2022; Meidan, Bonner e Michniak, 2005).

Portanto, as nanoemulsões são sistemas altamente eficazes para a liberação de ativos, apresentando vantagens significativas no desenvolvimento de formulações. Elas oferecem notável estabilidade e melhoram a biodisponibilidade de compostos bioativos, como óleos essenciais, destacando-se como uma alternativa viável para a liberação de ativos, especialmente no tratamento de

condições relacionadas à cicatrização da pele. Além disso, o direcionamento dessas nanoemulsões para os folículos pilosos representa uma abordagem inovadora, permitindo uma penetração mais profunda e eficaz dos princípios ativos. Essa via de entrega não apenas potencializa a absorção dos compostos, mas também oferece uma liberação controlada, o que pode ser particularmente benéfico para tratamentos que visam o reparo da pele em feridas e outras condições dermatológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a atividade do BDO em relação à migração celular e desenvolver nanoemulsões inovadoras à base deste óleo para aplicações tópicas, com foco em surfactantes APG livres de PEG, avaliando suas propriedades físico-químicas e potencial de irritação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivos específicos deste trabalho incluem:

- a) Avaliar a citotoxicidade do BDO *in vitro* em fibroblastos;
- b) Analisar a taxa de migração celular induzida pelo BDO utilizando a técnica de Scratch Assay;
- c) Desenvolver nanoemulsões contendo o BDO;
- d) Caracterizar as nanoemulsões desenvolvidas quanto ao pH, diâmetro hidrodinâmico médio, Pdl, PZ e condutividade;
- e) Determinar os teores de β -cariofileno e *l*-nerolidol no BDO e na nanoemulsão por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- f) Realizar a caracterização das nanoemulsões por Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho (IV);
- g) Avaliar a tensão superficial do surfactante em diferentes pH;
- h) Investigar o potencial de irritação ocular do BDO e das nanoemulsões por meio do teste na Membrana Corioalantoica de Ovo de Galinha (HET-CAM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO BDO *IN VITRO*

4.1.1 Cultura de células

O teste de viabilidade celular foi realizado pelo método descrito por Mosmann, empregando o ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (ensaio MTT) (Mosmann, 1983). Células de fibroblastos de pele humana normal (CCD1059Sk) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, São Paulo, Brasil) e 1% de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas em frascos de cultura a 37°C em atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂) até atingir 80% de confluência.

4.1.2 Preparação das células

Após o crescimento celular, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, as células foram incubadas com 1000 µL de solução de tripsina por 5 minutos para descolamento das células. Após, a tripsina foi neutralizada com DMEM, e a suspensão celular foi recolhida e centrifugada a 100 xg por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em DMEM. Uma diluição celular de 1:20 foi realizada, e a contagem celular foi feita em uma câmara de Neubauer para determinar a densidade celular. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, com uma densidade de 5×10^3 células por poço. As placas foram então incubadas por 24 horas para permitir a adesão das células à superfície do poço.

4.1.3 Teste de citotoxicidade

O BDO foi primeiro solubilizado em 1,25% de DMSO e água (20 mg/mL). As células foram tratadas com soluções do óleo em concentrações variadas (500 – 3,9 µg/mL, em quadruplicata) preparadas por diluições seriadas. Soluções de DMSO de concentrações variadas foram utilizadas como controles de solvente para cada concentração do óleo testado. Também foram utilizados meio de cultura (DMEM) sem amostra (controle negativo) e DMSO 2% (v/v) (controle positivo).

Após 48 horas de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), seguido de incubação por 4 horas a 37°C. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de solução de isopropanol. A absorbância foi medida num leitor de microplacas a 570 nm e a viabilidade celular a 645 nm foi calculada em relação ao controle negativo, considerada como 100% de viabilidade celular. As porcentagens de viabilidade celular para células tratadas com óleo essencial em diferentes concentrações foram determinadas por regressão não linear utilizando GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (DP).

4.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MIGRAÇÃO CELULAR DO BDO *IN VITRO* (Scratch assay)

Para avaliar o efeito *in vitro* do óleo essencial em diferentes concentrações na migração celular de células de fibroblastos dérmicos humanos (CCD1059Sk), foi empregado um modelo experimental baseado no teste de *scratch*. Inicialmente, as células foram submetidas à tripsinização e centrifugação (100xg por 4 minutos). O meio foi descartado e as células foram ressuspensas em DMEM para contagem celular. Posteriormente, $3,5 \times 10^5$ células/poço foram inoculadas na placa de 24 poços e permaneceram por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até

atingirem aproximadamente 100% de confluência por poço. Após esse período de adesão celular, uma ferida artificial e uniforme foi criada em cada poço utilizando uma ponta de pipeta estéril de 200 µL. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover células desprendidas, e o meio de crescimento foi substituído por meio fresco contendo o óleo essencial a 500 e 250 µg/mL. Além disso, também foram realizados controles negativos utilizando DMSO 2% e controle de células apenas com o meio de cultura.

Os poços foram fotografados no tempo zero (T0) para registrar a condição inicial da ferida utilizando um microscópio invertido equipado com um sistema de captura de imagem. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por períodos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. As fotografias foram capturadas em intervalos de tempo pré determinados para monitorar a migração celular ao longo do tempo. Por fim, as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e as taxas de fechamento das feridas foram calculadas utilizando a equação 1:

$$\%F = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde A_0 representa a área inicial da ferida e A_t é a área da ferida após cada intervalo de tempo.

4.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES TERNÁRIO

O diagrama de fases ternário é uma ferramenta útil para determinar a melhor combinação de água, óleo e surfactante em uma mistura ternária (Dhoot *et al.*, 2018). Este processo foi conduzido utilizando uma metodologia de titulação volumétrica descrita anteriormente (Barradas *et al.*, 2015). O BDO serviu como fase oleosa. O surfactante não iônico foi selecionado devido ao seu perfil de tolerância para uso tópico, pois é considerado mais seguro e menos tóxico do que os surfactantes iônicos (Azeem, Rizwan, Ahmad, F. J., *et al.*, 2009). Neste contexto,

optou-se pelo uso do Plantacare® 818 (Coco-Glucoside), glicosídeo de álcool graxo C8-16, número CAS 141464-42-8, que foi gentilmente doado pela BASF, Brasil. Diferentes proporções de surfactante:óleo foram produzidas de 1:9 a 9:1 (m/m). Vale ressaltar que a amostra de P818 utilizada neste estudo continha 47-49% de água, sendo considerado uma mistura de P818 em 51-53% em peso, segundo o fabricante.

A variação na relação óleo:surfactante foi analisada macroscopicamente através da observação visual das fases e da variação da estabilidade (isto é, formação de creme ou separação de fases) após cada titulação. As formulações foram classificadas em macroemulsões cremosas, macroemulsões líquidas e microemulsões para aquelas com aspecto translúcido e sem separação de fases.

4.4 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Com base nos dados obtidos no diagrama de fases, quatro formulações promissoras contendo o BDO foram selecionadas (Tabela 1) de acordo com sua aparência macroscópica translúcida para processamento no processador ultrassônico (Ultrasonics®, Newtown, EUA). Inicialmente, o óleo essencial foi pesado em um frasco, enquanto, em outro recipiente, a água e o surfactante foram misturados. Após uma homogeneização inicial para misturar os componentes, a emulsão grosseira foi processada em processador ultrassônico por 3 minutos, a 90% de amplitude sob banho de gelo.

Tabela 1 - Cálculo da quantidade de constituintes em porcentagem (%) das formulações selecionadas

Formulação	Surfactante	Óleo essencial
F1	18%	18%
F2	18%	9%
F3	14%	14%
F4	14%	7%

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

O pH das formulações foi medido em triplicata à temperatura ambiente por meio de um medidor de pH (PG2000, GEHAKA, São Paulo, Brasil). A formulação F1 (pH 11,5), foi selecionada para ajuste de pH com ácido cítrico a 20%, resultando em F1 com pH ajustado de 6,5 (F1 (pH 6,5)). A escolha de F1 baseou-se em seu maior teor de óleo essencial, característica que pode potencializar os efeitos terapêuticos da formulação.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E DETERMINAÇÃO DE *TRANS*-NEROLIDOL E β -CARIOFILENO NO BDO

4.5.1 Diâmetro hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersão (Pdl), Potencial Zeta (PZ) e Condutividade

Para análise de PZ e medições de condutividade, as amostras foram colocadas em células eletroforéticas no dispositivo Zetasizer, Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). A análise do diâmetro hidrodinâmico médio das gotas e Pdl por DLS foi realizada em temperatura ambiente (25°C) após diluição 1:100 das formulações em água destilada, em cubeta de quartzo de 5 mL utilizando Zetasizer, Dispositivo Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments,

Malvern, UK) para obter informações do diâmetro e distribuição das gotículas dispersas. Os valores obtidos correspondem à média \pm desvio padrão de três medidas de cada formulação. As medições do diâmetro hidrodinâmico médio e do Pdl foram realizadas para todas as amostras de nanoemulsões obtidas (F1, F2, F3 e F4) imediatamente após seu processamento. O estudo de estabilidade incluiu medições aos 7, 14, 21, 28, 45, 60 e 90 dias para as formulações F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5) mantidas em temperatura ambiente.

É importante ressaltar que, devido à concentração dos sistemas, estes foram previamente diluídos antes das leituras. Isso foi realizado para evitar possíveis interferências decorrentes de interações micelares, que poderiam comprometer a precisão das medições e a interpretação dos resultados, conforme sugerido por Lawrence e Rees (2000).

As análises de coalescência e maturação de Ostwald foram realizadas para entender o impacto do processo de desestabilização nas nanoemulsões. Para isso, foram construídos gráficos que permitiram observar a relação entre o tempo e o raio das gotas. Um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,9 indica um ajuste linear satisfatório, o que significa que as gotas estão mudando de tamanho de forma previsível ao longo do tempo.

A taxa de coalescência foi quantificada com base na equação proposta por Musa *et al.* (2017), que relaciona o tempo e o raio da gota através da seguinte equação 2:

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - (8\pi/3)\omega t \quad (2)$$

Onde 'r' representa o raio médio após um intervalo de tempo específico, ' ω ' é a frequência de quebra por unidade de área do filme e ' r_0 ' é o valor inicial em $t = 0$. Assim, a taxa de coalescência é determinada construindo um gráfico de $1/r^2$ em função do tempo, esperando uma relação linear (Musa *et al.*, 2017).

Além disso, de acordo com a teoria de Lifshitz, Slyozov e Wagner (Lifshitz e Slyozov, 1961), é prevista uma relação linear entre r^3 e o tempo de armazenamento.

Esta teoria é expressa pela seguinte equação 3:

$$\omega = dr^3/dt = 8/9[C(\infty)\gamma V_m D/\rho RT] \quad (3)$$

Nesta equação, ' ω ' representa a frequência de quebra por unidade de área do filme, ' r ' é o raio médio da gota ao longo do tempo, ' t ' é o tempo de armazenamento em segundos, ' $C(\infty)$ ' é a solubilidade da fase dispersa, ' V_m ' é o volume molar da fase interna, ' D ' é o coeficiente de difusão da fase dispersa na fase contínua, ' ρ ' é a densidade da fase dispersa, ' R ' é o gás constante e ' T ' é a temperatura absoluta.

4.5.2 Determinação dos teores de nerolidol e β -cariofileno no BDO e na nanoemulsão por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação de β -cariofileno e nerolidol no óleo essencial e nas nanoemulsões realizada por CLAE seguiu o método previamente validado por Nogueira e colaboradores (2023) com adaptações. Foi utilizado o equipamento modular de CLAE (Waters®, Milford, Massachusetts, EUA) composto por uma bomba binária (Waters®1525), um detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters®2998) e um injetor automático (Waters®2707). Os dados foram processados utilizando o software Empower®3 (Waters®, Milford, Massachusetts, EUA). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Promosil, Agela Technologies®, Torrance, Califórnia, EUA, 4,6 × 150 mm, 5 μ m). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker, México) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®) com 0,1% de ácido acético glacial grau CLAE (Dinâmica®, pureza de 99,7%). Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana PVDF de poro 0,45 μ m e diâmetro de 47 mm com o auxílio de um sistema acoplado à bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos com o auxílio de banho de ultrassom.

As amostras foram analisadas em sistema de eluição isocrático de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético (85:15 v/v), sob fluxo de 1 mL/min, com volume de injeção de 20 μ L em comprimento de onda de 210 nm. Os padrões

analíticos de β -cariofileno (pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) e nerolidol, mistura do *cis* e *trans* (pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) e o BDO, obtido comercialmente do fornecedor Fazenda Terramami, (Silveiras, São Paulo, Brasil) e gentilmente doado pela Amantikir Origem Natural (São Lourenço, Minas Gerais, Brasil), foram diluídos em acetonitrila até a concentração de 1 mg/mL. Todas as soluções de padrões e amostras foram filtradas em filtros PVDF de 0,45 μm acoplados às seringas. Curvas de calibração foram preparadas a partir de soluções padrão (7,8 $\mu\text{g/mL}$ a 1 mg/mL) para quantificação, e os resultados foram expressos em miligramas de nerolidol e β -cariofileno por mililitro de BDO. A identificação dos compostos presentes no BDO foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos das amostras e dos padrões analisados nas mesmas condições e pelos espectros de absorção obtidos.

4.5.3 Determinação dos teores de nerolidol e β -cariofileno por CLAE nas nanoemulsões

Para analisar a reprodutibilidade do processo de preparação da formulação, foram quantificados os teores de β -cariofileno e nerolidol nas formulações, seguindo a metodologia CLAE descrita anteriormente (tópico 4.4.2). Nanoemulsões ($n=3$) foram diluídas em acetonitrila para concentração de 5 mg/mL. Para a quantificação de nerolidol e β -cariofileno nas formulações, foram elaboradas curvas de calibração a partir de soluções padrão em diferentes concentrações de 7,8 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando os padrões β -cariofileno (pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) e nerolidol, mistura do *cis* e *trans* (pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich).

4.5.4 Espectroscopia Raman e espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

Para investigar possíveis alterações na interação química entre o surfactante e o óleo essencial nas formulações em diferentes pH, foram realizados espectros de

Raman e infravermelho. Os espectros de Raman foram adquiridos utilizando um espectrômetro Raman interferométrico Bruker RFS 100, com comprimento de onda de excitação de 1064 nm. O instrumento é equipado com um detector de germânio resfriado por nitrogênio líquido. As medições foram feitas com 512 acumulações, resolução espectral de 4 cm^{-1} e potência do laser ajustada para 200 mW.

Os espectros infravermelhos foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker FTIR modelo Vertex, acoplado a um acessório de refletância total atenuada de diamante (ATR). Os espectros foram acumulados ao longo de 128 varreduras com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.6 TENSÃO SUPERFICIAL

Para investigar possíveis mudanças na organização da estrutura molecular do surfactante P818 em dois níveis de pH diferentes (ou seja, 6,5 e 11,5), a tensão superficial foi medida em duplicata para duas soluções de APG a 20% em peso (20% P818 em pH 6,5 e 20% em peso P818 em pH 11,5) em um intervalo de 1 a 900 segundos usando um tensiômetro de análise de perfil de gota PAT1 (SINTERFACE Technologies, Alemanha) em temperatura ambiente. Gotas de óleo foram formadas na ponta do capilar e inseridas em uma cubeta cheia de água ultrapura.

4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO PELO TESTE COM MEMBRANA CORIOALANTOICA DO OVO DE GALINHA (HET-CAM)

Ovos de galinha fertilizados foram selecionados e incubados sob rotação a 37,5°C por 8 dias. Após este período, ovos não viáveis foram identificados por meio de ovoscopia e descartados. Os ovos viáveis foram mantidos na incubadora com a câmara de ar voltada para cima e rotação desativada. No décimo dia de incubação,

a casca ao redor da câmara de ar dos ovos viáveis foi cuidadosamente removida para expor a membrana corioalantoica.

Foram preparadas as soluções controle, que incluíram cloreto de sódio 0,9% (NaCl pureza > 99%) como controle negativo e hidróxido de sódio 0,1 M (NaOH grau reagente, pureza 97%), obtidos da Sigma-Aldrich Co., Ltd., como controles positivos. Além disso, o BDO puro e BDO:azeite de oliva (1:1), juntamente com as formulações F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5), foram aplicados diretamente na membrana corioalantoica em um volume de 0,3 mL, seguindo procedimentos similares para os controles (Luepke e Kemper, 1986).

Após a aplicação das soluções, a integridade e a resposta da membrana foram visualmente avaliadas durante um período de 300 segundos. As reações foram pontuadas de acordo com o tempo de aparecimento de cada efeito, hemorragia, lise e coagulação, seguindo critérios pré-definidos por Luepke (1985). As pontuações são atribuídas a cada efeito observado, que somadas representam a pontuação total de irritação (IS), usada para classificar as substâncias em diferentes categorias: não irritante (0,0–0,9), irritante leve (1,0–4,9), irritante moderado (5,0–8,9) e irritante grave (9,0–21,0). Cada experimento foi conduzido utilizando três ovos para cada solução testada (ICCVAM, 2010; Luepke, 1985).

O escore total de irritação (IS) é calculado atribuindo pontuações específicas com base no tempo (em segundos) em que cada reação aparece: se a lise ocorrer dentro de 30, 120 ou 300 segundos, serão dadas pontuações de 5, 3 ou 1, respectivamente. Para hemorragia são atribuídas pontuações de 7, 5 ou 3, e para coagulação são atribuídas pontuações de 9, 7 ou 5, dependendo do momento da ocorrência. Essas pontuações são então somadas para obter o IS. O teste HET-CAM é considerado aceitável se o controle negativo (NaCl 0,9%) for classificado como não irritante (IS próximo de 0) e o controle positivo (NaOH 0,1 M) for classificado como altamente irritante (IS > 9), com o IS variando entre 10 e 19 (ICCVAM, 2010; Luepke, 1985).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0[®] (GraphPad Inc., EUA). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes grupos foram comparados pelo método de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas para valores de $p < 0,05$.

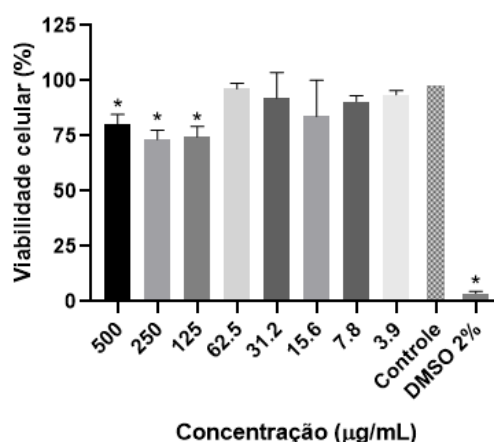
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE DO BDO

A citotoxicidade do BDO foi avaliada na linhagem não tumoral de fibroblastos humanos (CCD1059Sk), utilizando o ensaio MTT para caracterizar a viabilidade celular. Esse ensaio baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzir o sal MTT, gerando cristais de formazan, um composto insolúvel de cor roxa, cuja formação reflete a atividade mitocondrial das células (Mosmann, 1983). A Figura 6 apresenta a porcentagem de viabilidade após 48 horas de incubação com diferentes concentrações de óleo essencial.

Como esperado, as células controle em DMEM (controle negativo) apresentaram 100% de viabilidade, enquanto o grupo tratado com DMSO 2% (controle positivo) apresentou diminuição significativa da viabilidade celular, confirmando que eram suscetíveis a substâncias nocivas. Concentrações de BDO de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle, mas mantendo a viabilidade celular superior a 70%.

Figura 6 - Porcentagem de Viabilidade Celular após 48 horas de incubação



Resultados do MTT mostrando a porcentagem de viabilidade das células CCD1059Sk após tratamento com BDO por 48 h. DMSO 2% foi utilizado como controle positivo. A diferença

significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA dois fatores, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett; $n = 4$, média \pm DP. *($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

A citotoxicidade dos extratos hidroalcoólicos e etanólicos de *B. dracunculifolia* foi relatada para diferentes linhagens celulares, como queratinócitos humanos (Nok-1) e células Vero derivadas do rim do macaco verde africano (ATCC CCL-81). Os extratos de *B. dracunculifolia* foram classificados como pouco citotóxicos em concentrações de até 7 mg/mL em células Nok-1. Além disso, o IC_{50} da monocamada de células Vero foi superior a 2.000 μ g/mL para o extrato hidroalcoólico (Bonin *et al.*, 2020; Domingos Neto *et al.*, 2023).

No entanto, pouco se sabe sobre a citotoxicidade do BDO. No estudo realizado por Parreira *et al.* (2010), a atividade citotóxica do BDO foi avaliada contra células Vero. Nenhuma citotoxicidade foi observada em concentrações até a dose máxima testada de 10 μ g/mL, indicando que o BDO apresenta um perfil de segurança em concentrações baixas (Parreira *et al.*, 2010). De forma similar, o presente trabalho demonstrou que, mesmo em concentrações mais elevadas de BDO (500, 250 e 125 μ g/mL), as células mantiveram a viabilidade superior a 70%. Neste contexto, este trabalho pode contribuir no avançar na compreensão da citotoxicidade do BDO, especialmente tendo em conta que os dados mais recentes sobre este tema foram publicados há anos. Os resultados obtidos fornecem dados relevantes sobre a citotoxicidade do BDO em fibroblastos, que são células-chave presentes na derme e envolvidas em diversas funções da pele, incluindo a cicatrização de feridas (Pensalfini e Tepole, 2023). Esses dados contribuirão para o conhecimento sobre a segurança do BDO, que poderá ser utilizado como ingrediente com potencial terapêutico em formulações tópicas.

5.2 TAXA DE MIGRAÇÃO CELULAR DO BDO

O ensaio de *scratch test* é amplamente empregado para avaliar a capacidade de células migrarem em resposta a diferentes estímulos, incluindo compostos farmacêuticos que podem influenciar esse processo. Neste experimento, foi observado o processo de reepitelização, fundamental para a regeneração da pele após uma lesão. A reepitelização é um processo complexo que envolve o fechamento da ferida, sendo mediado por três principais etapas: migração, proliferação e diferenciação celular. Inicialmente, as células migram para a área danificada para cobrir a lacuna formada pelo arranhão. Em seguida, ocorre a proliferação celular para repor as células perdidas. Finalmente, as células migratórias se diferenciam para restaurar as funções da epiderme danificada. O monitoramento desses parâmetros durante o ensaio de *scratch* fornece *insights* valiosos sobre processo de cicatrização cutânea (Rittié, 2016).

Micrografias capturadas ao longo de 72 horas de tratamento com BDO revelaram efeitos dose-dependentes na migração celular e no fechamento da ferida. Os resultados indicaram que, quando a concentração de BDO foi de 500 µg/mL, a taxa de fechamento da ferida foi maior do que quando a concentração utilizada foi de 250 µg/mL. Isso sugere que o efeito de BDO no reparo da ferida aumenta com a dose aplicada (Figura 7).

A migração celular no grupo tratado com BDO a 500 µg/mL foi 1,65 e 1,53 vezes maior que no grupo controle ($p \leq 0,05$) após 24 e 48 horas, respectivamente. O BDO apresentou taxas de fechamento de aproximadamente 71% em 24 horas e 78% após 48 horas e o grupo controle apresentou taxas de fechamento de 43% em 24 horas e 51% em 48 horas. No entanto, após 72 horas, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com BDO apresentaram taxas de fechamento semelhantes, sugerindo que BDO a 500 µg/mL acelerou o reparo da pele nas primeiras fases.

Figure 7 - Ensaio de migração celular

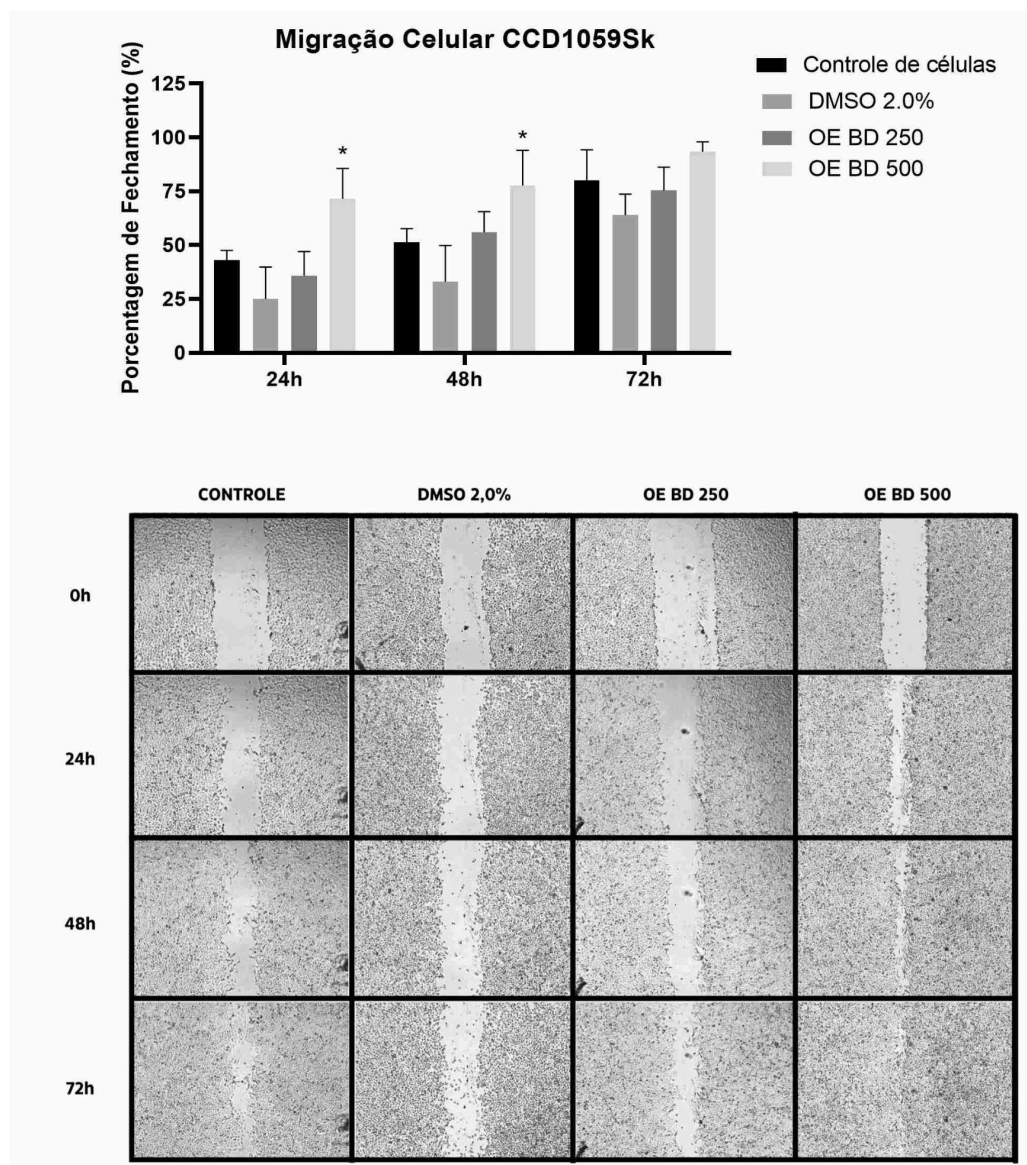


Gráfico e imagens representativas mostrando a migração celular no fechamento da ferida realizada em monocamadas de linhas celulares de fibroblastos humanos CCD1059Sk após tratamento com BDO a 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ (OE BD 250 e 500) e DMSO 2,0%. As imagens foram capturadas nos horários 0h, 24h, 48h e 72h. Diferenças significativas entre controle e tratamentos foram determinadas por ANOVA de dois fatores, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett ($n = 3$, média \pm DP). * $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

O reparo da pele envolve vários estágios, conforme previamente mencionado, incluindo hemostasia, inflamação, migração, proliferação e maturação celular (Rittié,

2016). Ferreira e colaboradores (2016) avaliaram o nerolidol na eficácia da cicatrização de feridas *in vivo*, combinado com uma formulação de hidrogel à base de quitosana. Os resultados revelaram que o hidrogel incorporando 2% de nerolidol apresentou efeitos curativos notáveis, superando a eficácia do tratamento padrão-ouro com collagenase de *Clostridium histolyticum*. A formulação demonstrou reepitelização acelerada e reorganização precoce do colágeno já no 7º dia de tratamento.

Além disso, o β -cariofileno, conhecido pelos seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, mostrou ter um grande potencial na cicatrização de feridas *in vitro*, promovendo o fechamento de feridas (Baldissera *et al.*, 2017; Basha e Sankaranarayanan, 2016; Gertsch *et al.*, 2008). No estudo de Koyama *et al.* (2019), descobriu-se que a exposição ao β -cariofileno (diluído em DMSO na concentração de 6 μ M) aumenta a migração celular em fibroblastos e queratinócitos cultivados de camundongos C57BL/6. Após 24 horas, o número de fibroblastos foi 2,1 vezes maior e o número de queratinócitos foi 2,5 vezes maior em comparação com o grupo controle. No entanto, esse efeito não foi observado em fibroblastos de camundongos geneticamente modificados para não expressar o receptor CB2, sugerindo que a ativação desse receptor pode ser importante para a migração celular (Koyama *et al.*, 2019). Além disso, no estudo de KK *et al.* (2024), o β -cariofileno foi avaliado em fibroblastos de pele L929 a uma concentração de 145,3 μ M, mostrando que após 48 horas, cerca de 91,34% da área arranhada foi reepitelizada (Kk *et al.*, 2024).

Até o momento, não há registros de dados sobre o reparo da pele e resultados de ensaios de avaliação realizados com o BDO. Portanto, os resultados do ensaio de *scratch* deste estudo ressaltam o potencial promissor do BDO na cicatrização de feridas, possivelmente devido a compostos como nerolidol e β -cariofileno. Essas descobertas evidenciam o potencial terapêutico do BDO para formulações tópicas, visando melhorar os processos de reparação da pele, e indicam a necessidade de investigações futuras na área da cicatrização cutânea.

5.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES TERNÁRIO

O desenvolvimento de um diagrama de fases ternário fornece uma compreensão abrangente das características composicionais de diferentes misturas de três componentes e seus respectivos comportamentos de fase (Chew e Reinhardt, 2023). Sistemas estáveis são frequentemente selecionados pela sua capacidade de demonstrar a eficácia do surfactante na redução da tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa. Esses sistemas podem originar emulsões e microemulsões macroscópicas, que podem apresentar-se transparentes ou translúcidas (Silva *et al.*, 2020). Estas observações destacam a influência das proporções dos componentes na estabilidade e nas características dos sistemas baseados em emulsões (Jhawar, Gulia e Sharma, 2021; Shafiq-un-Nabi *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no diagrama de fases ternário (Figura 8) revelaram informações importantes sobre o equilíbrio de água, óleo (BDO) e surfactante em uma mistura ternária, mostrando como esses componentes estão distribuídos e interagem em diferentes proporções. Durante a construção do diagrama, as misturas exibiram variações significativas de comportamento dependendo das proporções relativas de óleo, surfactante e água. As áreas delineadas no diagrama refletem diferentes regimes de emulsão: macroemulsões cremosas, macroemulsões líquidas e microemulsões. Observou-se que sistemas contendo aproximadamente 10% de surfactante e baixas concentrações de óleo são capazes de fornecer microemulsões espontaneamente. Porém, à medida que a concentração do óleo aumenta, a transparência do sistema diminui, refletindo uma transição de fase para macroemulsões, que podem ser classificadas como cremosas ou líquidas, dependendo da sua viscosidade. Tal transição pode ser provavelmente seguida por um aumento no diâmetro das gotas, capazes de dispersar a luz visível, resultando em um sistema opaco (Barradas *et al.*, 2015).

Curiosamente, na região central do diagrama são novamente observadas microemulsões, onde as concentrações de óleo e surfactante são aproximadamente

equivalentes (variando de aproximadamente 13 a 40%), enquanto a concentração de água varia de 70% a 15%. Neste ponto, a redução da tensão interfacial pelo surfactante, a solubilização mútua das fases e a flexibilidade do filme interfacial permitem a formação de estruturas bicontínuas estáveis (De Gennes e Taupin, 1982; Lindman *et al.*, 1989; Olsson e Wennerström, 1994). A região central representa uma zona de transição onde as propriedades das fases são equilibradas, resultando em microemulsões estáveis e interligadas.

Figura 8 - Diagrama de fases ternário

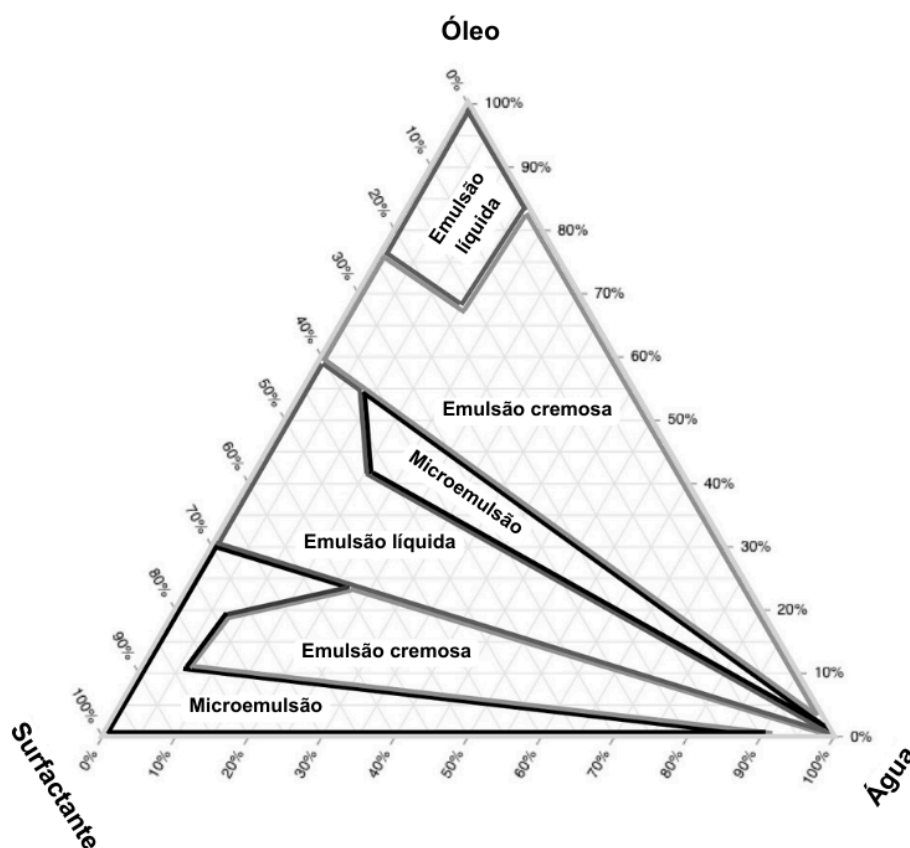


Diagrama de fases ternário criado usando TernaryPlot.com. Foram obtidos 99 pontos pelo método de titulação com relação óleo/surfactante variando de 1:9 a 9:1. As diferentes áreas do diagrama representam macroemulsões cremosas, macroemulsões líquidas e microemulsões.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Os resultados obtidos no diagrama de fases indicaram que as formulações

localizadas próximas à região da microemulsão, devido à sua baixa viscosidade e aparência translúcida, são as mais promissoras para processamento ultrassônico. Com base nessas observações, quatro formulações foram selecionadas para o processamento por ultrassonicação. A Formulação 1 contém 18% de surfactante e 18% de óleo essencial, a Formulação 2 possui 18% de surfactante e 9% de óleo essencial, enquanto as Formulações 3 e 4 apresentam 14% de surfactante com 14% e 7% de óleo essencial, respectivamente (descrito na Tabela 1).

5.4 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Após o processamento ultrassônico, verificou-se macroscopicamente que todos as quatro nanoemulsões foram obtidas com sucesso, pois passaram de opacas a translúcidas, sugerindo a formação de gotículas de diâmetro nanométrico, corroborando com o estudo de Asadinezhad *et al.*, 2019.

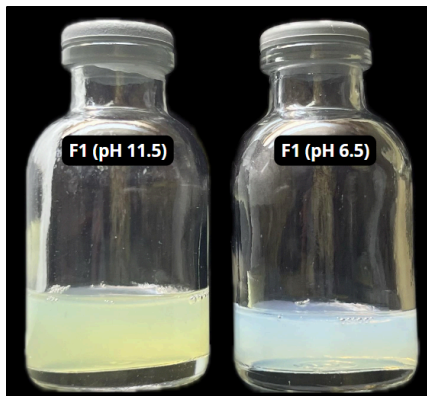
As soluções de coco-glicosídeo apresentam pH alcalino, o que é inadequado para aplicações na pele (Geetha e Tyagi, 2012). Durante o desenvolvimento das formulações, as análises de pH indicaram valores próximos de 11,5 para todas as nanoemulsões. Esse resultado está de acordo com a literatura, que também relata pH superior a 8 para soluções comerciais de APG, geralmente disponíveis em concentrações de 20% em peso (Beall e Sloan, 2002; Pajić *et al.*, 2017; Roberts e Sloan, 2003). A adição de BDO não teve impacto significativo nos valores de pH observados nas formulações. Contudo, essa condição alcalina é inadequada para aplicação na pele, que exige um pH entre 4,1 e 5,8 para manter a homeostase e a permeabilidade da barreira cutânea, o equilíbrio microbiano e evitar descamação excessiva (Proksch, 2018).

Além disso, é importante destacar que o valor de pH está relacionado à diferenciação dos queratinócitos, bem como à produção e funcionalidade dos lipídios epidérmicos e do envelope lipídico dos corneócitos (Jia *et al.*, 2018). Consequentemente, um desequilíbrio nos valores de pH está frequentemente relacionado com condições inflamatórias da pele. Por exemplo, em condições

alérgicas da pele e dermatite atópica lesional, observa-se um aumento nos valores de pH local, com uma variação entre 0,2 e 0,3 unidades de pH em comparação com a pele não afetada. Esse pH elevado também é observado em peles secas e envelhecidas (Eberlein-König *et al.*, 2000; Proksch, 2018; Rippke, Schreiner e Schwanitz, 2002). A normalização do pH da pele através da acidificação via tratamento tópico pode promover efeitos benéficos para a microbiota da pele, reparação da barreira cutânea, favorecer a diferenciação epidérmica e reduzir a resposta inflamatória (Lukic *et al.*, 2021).

Portanto, o pH foi ajustado para próximo de 6,5 para posterior avaliação, utilizando ácido cítrico a 20%, o que levou à turbidez (Figura 9), provavelmente devido às alterações nas propriedades interfaciais do APG. Foi demonstrado que o filme interfacial constitui o principal local para a solubilização da maioria das moléculas de fármacos (ElMeshad e Tadros, 2011). Tal fenômeno pode ter levado a uma alteração na solubilidade dos componentes do BDO, contribuindo para as alterações macroscópicas observadas como consequência do ajuste do pH, ou seja, mudança de cor do sistema líquido amarelo pálido para uma amostra azulada. As diferenças observadas no aspecto das nanoemulsões refletem variações no diâmetro das gotículas; as menores, geralmente abaixo de 100 nm, têm uma capacidade reduzida de dispersar luz, resultando em emulsões mais claras e transparentes. Em contraste, gotículas maiores tendem a dispersar mais luz, aumentando a opacidade e impactando a coloração final do sistema (Anton e Vandamme, 2011; Solans *et al.*, 2005). Além disso, as nanopartículas são afetadas pelo fenômeno do espalhamento Rayleigh, que indica que gotículas muito pequenas são mais eficazes em espalhar comprimentos de onda de luz mais curtos, como o azul (Santra, Shneider e Car, 2017).

Figura 9 - Aparência macroscópica comparativa entre F1 (pH 6,5) e o controle F1 (pH 11,5).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Os APG são conhecidos como surfactantes não iônicos com características vantajosas, como extensa biodegradabilidade (Gamia *et al.*, 1997) e excelente compatibilidade dermatológica (Mehling, Kleber e Hensen, 2007; Pezron, Galet e Clausse, 1996). Além disso, eles são considerados independentes de eletrólitos e de temperatura (EIMeshad e Tadros, 2011). Vale a pena notar que o componente glicosídeo é responsável pela solubilidade em água das moléculas de APG (EIMeshad e Tadros, 2011). O comportamento sensível ao pH dos surfactantes APG, que permanece pouco explorado na ciência, destaca uma área significativa para futuras pesquisas. Compreender e aproveitar esta sensibilidade pode levar a aplicações inovadoras e melhor desempenho em diversas formulações.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

5.5.1 Diâmetro hidrodinâmico médio, Pdl, PZ e condutividade

A análise do diâmetro hidrodinâmico médio das gotas por DLS se fundamenta no princípio do movimento browniano, no qual partículas e moléculas de menor diâmetro exibem um movimento térmico aleatório mais rápido em comparação às maiores. Este fenômeno de difusão está relacionado à velocidade com a qual essas partículas se movem, sendo que as menores tendem a se difundir

mais rapidamente do que as maiores (Bhattacharjee, 2016).

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio das gotas para as formulações F1 a F4 foi analisada imediatamente após seu preparo (tempo zero) (Tabela 2). A distribuição dos diâmetros médios das gotas são apresentados nas Figuras 10 e 11.

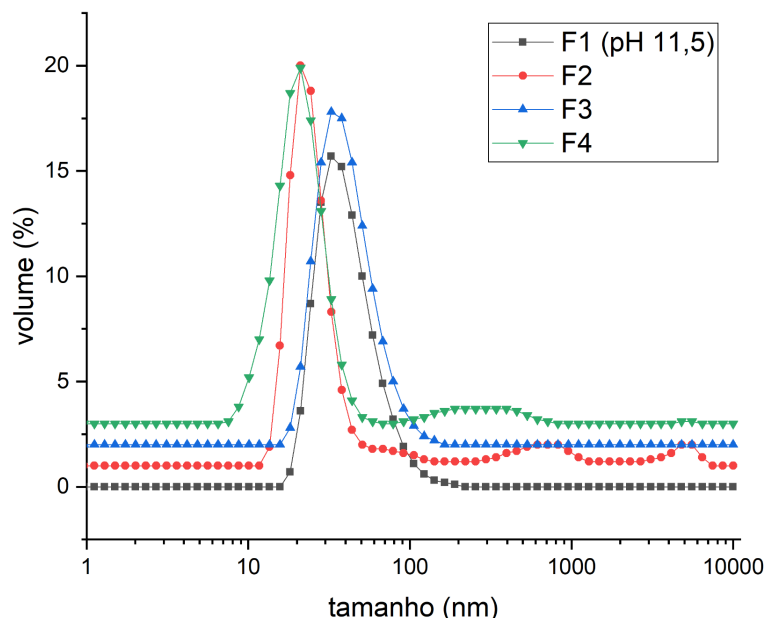
Tabela 2 - Diâmetro das gotículas em nanômetros (\pm DP) e Pdl (\pm DP) imediatamente após seu processamento

Formulação	Diâmetro das gotas (nm) (\pm DP) e Pdl (\pm DP)	
F1 (pH 11,5)	59,27 \pm 0,25**	0,183 \pm 0,01*
F2	240,6 \pm 21,98*	0,625 \pm 0,21*
F3	55,42 \pm 1,19**	0,148 \pm 0,006*
F4	195,3 \pm 2,82*	0,327 \pm 0,004*

Diferenças significativas entre as formulações foram determinadas por ANOVA, (n = 3, média \pm DP). *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001. Comparações foram feitas entre as formulações F1 e F3, e entre F2 e F4.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Figura 10 - Distribuição de diâmetro das gotas das formulações F1, F2, F3 e F4 desenvolvidas no tempo 0.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

As análises estatísticas revelaram diferenças significativas nos diâmetros das gotas e nos valores de Pdl entre as formulações. A formulação F1 (pH 11,5) apresentou diâmetro médio de gotas de $59,27 \text{ nm} \pm 0,25$, enquanto a formulação F3 apresentou $55,42 \text{ nm} \pm 1,19$, com diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$). Da mesma forma, ao comparar F2 e F4, F2 apresentou diâmetro de $240,6 \text{ nm} \pm 21,98$ e F4 apresentou diâmetro de $195,3 \text{ nm} \pm 2,82$, também com diferença significativa ($p \leq 0,05$). Em relação ao Pdl, a formulação F1 teve valor de 0,179, enquanto a formulação F3 teve valor de 0,148, com diferença significativa ($p \leq 0,05$). Da mesma forma, comparando F2 e F4, F2 apresentou Pdl de 0,727 e F4 apresentou Pdl de 0,327, com diferença significativa ($p \leq 0,05$). Estes resultados indicam que as formulações não só diferem significativamente nos diâmetros das gotículas, mas também em termos de polidispersidade, conforme refletido pelos valores de Pdl.

As formulações F1 e F3, com proporção surfactante:óleo de 1:1,

demonstraram diâmetros de gotículas reduzidos, menores que 60 nm, e valores de Pdl próximos a 0,1, indicando uma distribuição monodispersa. A escolha do APG P818 como surfactante atendeu com sucesso às características desejadas para a nanoemulsão, visto que as formulações F1 e F3 demonstraram diâmetros pequenos e distribuição monodispersa, refletida em valores de Pdl na faixa ideal ($Pdl < 0,3$). Por outro lado, as formulações F2 e F4, que utilizaram uma proporção de surfactante de 2:1, exibiram gotículas com diâmetros maiores e valores de Pdl acima de 0,3.

Além disso, foi observada separação de fases macroscópica em F2 e F4 após 7 dias, indicando instabilidade. Esta instabilidade está diretamente ligada aos maiores valores de Pdl observados em F2 e F4 (0,727 e 0,327, respectivamente), que refletem uma distribuição mais ampla do diâmetro das gotas e aumento da polidispersidade. A distribuição de diâmetro mais ampla pode ser atribuída a maturação de Ostwald, um fenômeno onde gotículas menores, com maior solubilidade, gradualmente se dissolvem e se difundem em direção a gotículas maiores (Trujillo-Cayado *et al.*, 2020). Esta redistribuição leva a um aumento no diâmetro médio das gotas e desestabiliza ainda mais a emulsão ao longo do tempo (Musa *et al.*, 2017). À medida que as gotículas crescem, o sistema torna-se mais suscetível à separação macroscópica de fases, o que foi observado como resultado final em F2 e F4. A Figura 10 ilustra esse comportamento, com F2 e F4 apresentando distribuição de diâmetro de gota mais ampla em comparação a F1 e F3, e com diâmetros superiores a 100 nm, indicando um comportamento característico de amostras polidispersas, onde a variabilidade no diâmetro de gota é maior.

Para situar nossos achados no contexto das pesquisas existentes, comparamos nossos resultados com o estudo de Monteiro *et al.* (2023), que investigou o impacto da relação surfactante:óleo nas características de nanoemulsões carregadas com BDO. Neste estudo, Monteiro e colaboradores (2023) utilizaram Polissorbato 80 como surfactante, fixado em 20% para todas as formulações, com concentrações de BDO variando entre 20,0%, 15,0%, 10,0%,

7,5%, 5,0% e 2,5%. Os autores reportaram diâmetros de gotículas variando de 13,14 a 56,84 nm e Pdl entre 0,12 e 0,35. Observou-se que formulações com maior concentração de BDO resultaram em gotículas maiores, como na formulação F1 (20% BDO e 20% Polissorbato 80) que apresentou um diâmetro médio de gotícula de 56,84 nm \pm 0,80. Contudo, nossos resultados apresentaram comportamento diferente. Formulações com maiores concentrações de óleo (F1: 18% e F3: 14%) resultaram nos menores diâmetros de gotículas, sugerindo que o tipo de surfactante e as condições experimentais desempenharam um papel significativo. Além disso, a proporção 1:1 (surfactante:óleo) foi mais eficaz no controle do diâmetro das gotículas e do Pdl, em comparação com a proporção 2:1, que foi menos eficiente. Essa diferença sugere que, em nossas formulações, uma proporção mais equilibrada de surfactante e óleo resultou em nanoemulsões mais estáveis e com gotículas menores.

Monteiro e colaboradores (2023) utilizaram uma proporção surfactante:óleo 8 vezes maior, como observado na formulação F6 (20,0% de Polissorbato 80 e 2,5 % BDO). Isso sugeriu baixa estabilidade do filme interfacial e menor eficiência de encapsulamento da nanoemulsão estabilizada por Polissorbato 80. Em contraste, os nossos resultados com as formulações contendo APG indicam um comportamento distinto. O componente açúcar presente nos APG é naturalmente mais solúvel em água e menos solúvel em hidrocarbonetos quando comparada à unidade correspondente de polioxietileno, tornando os APG mais hidrofílicos que surfactantes à base de polioxietileno, como os polissorbatos. Essa diferença de estrutura resulta em comportamentos físico-químicos distintos dos APG em sistemas óleo-água, em comparação com surfactantes não iônicos convencionais. Isso influencia suas propriedades interfaciais (como interfaces água-ar, água-óleo e água-sólido), bem como seu comportamento em soluções, incluindo seu comportamento de fase (Nickel, Frster e Rybinski, 2008; Rybinski, von e Hill, 1998; Savić, Tamburić e Savić, 2010).

Além disso, é relevante notar que o Polissorbato 80, com um Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB) aproximado de 15, é adequado para emulsionar óleos de

lipofilicidade moderada (Takamura *et al.*, 1979). Da mesma forma, APG como caprilil/capryl glicosídeo (Plantacare® 810 UP, BASF, Alemanha) e decil glicosídeo (Plantacare® 2000 UP, BASF, Alemanha) apresentam valores de HLB semelhantes ao Polissorbato 80, aproximadamente 15 e 13, respectivamente (Pajić *et al.*, 2017). O BDO contém constituintes lipofílicos como *t*-nerolidol e β -cariofileno, cada um com valores de Log P em torno de 5,36 e 4,32, respectivamente. Esses constituintes contribuem significativamente para a lipofilicidade geral do BDO, influenciando potencialmente seu comportamento em formulações de emulsões e impactando a estabilidade e a distribuição do diâmetro das gotas (Chan *et al.*, 2016; DI Giacomo *et al.*, 2017).

ElMeshad *et al.* (2011) relataram o desenvolvimento de formulações utilizando surfactantes não iônicos APG (Plantacare® 2000 UP e P818). As emulsões demonstraram estabilidade termodinâmica, com diâmetros de gotas variando de 1,81 a 2,94 μm e baixo Pdl entre 1,13 e 2,59. Os autores observaram que o diâmetro médio das gotas das emulsões estudadas é diretamente proporcional ao teor de surfactante/cosurfactante e inversamente proporcional ao teor de óleo. A formulação contendo 50% de óleo e 45% de surfactante/cosurfactante apresentou o menor diâmetro médio de gota (1,81 μm), enquanto a formulação com 30% de óleo e 63% de surfactante/cosurfactante apresentou o maior diâmetro médio de gota (2,97 μm) (ElMeshad e Tadros, 2011).

Essas descobertas estão alinhadas com o estudo atual, onde as formulações F1 e F3, utilizando uma proporção de surfactante para óleo essencial de 1:1, também alcançaram pequenos diâmetros de gotículas (<60 nm) e baixos valores de Pdl ($\sim 0,1$), indicativos de sistemas monodispersos. Em contraste, formulações com maior proporção de surfactante (2:1) no presente estudo resultaram em diâmetros de gotículas maiores e valores de Pdl mais elevados ($> 0,3$), levando à separação de fases macroscópicas e instabilidade. Esses resultados destacam a importância de otimizar a seleção, proporções e métodos de produção de surfactantes para obter nanoemulsões estáveis e eficazes.

Para avaliar o diâmetro das gotas e o Pdl ao longo do tempo, as formulações

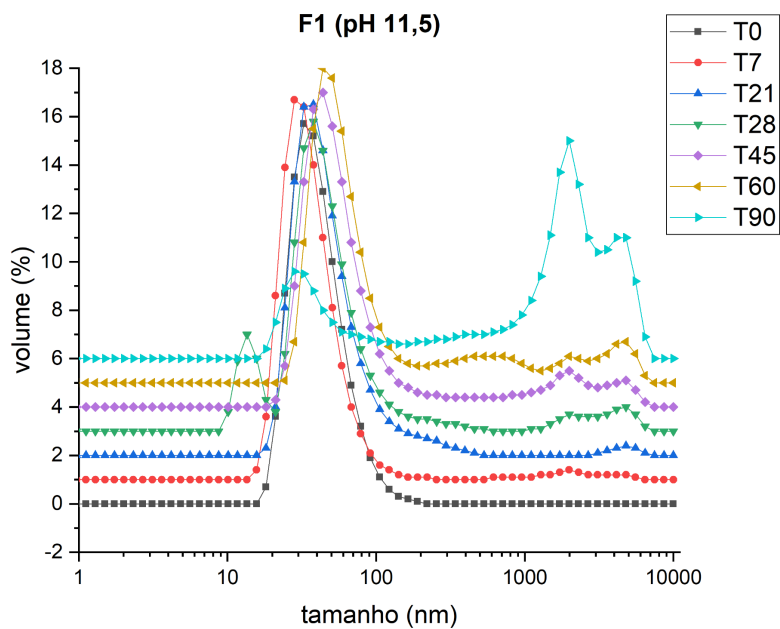
F1 (pH 11,5) e F1 (pH 6,5) foram analisadas aos 7, 21, 28, 45, 60 e 90 dias (Tabela 3; Figuras 11 e 12). Além disso, o PZ e a condutividade foram medidos aos 0, 28, 60 e 90 dias (Tabela 4). Esta análise teve como objetivo acompanhar as alterações nestes parâmetros durante um período prolongado.

Tabela 3 - Diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas em nanômetros (\pm DP) e Pdl (\pm DP) até 90 dias de processamento

Tempo	Diâmetros (nm) e Pdl	
	F1 (pH 11,5)	F1 (pH 6,5)
0d	59,27 \pm 0,25	78,75 \pm 0,20
	0,179 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02
7d	59,54 \pm 1,48	115,40 \pm 1,22
	0,276 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01
21d	90,30 \pm 1,25	111,90 \pm 1,73
	0,303 \pm 0,02	0,250 \pm 0,01
28d	90,44 \pm 0,97	115,40 \pm 0,89
	0,366 \pm 0,00	0,243 \pm 0,01
45d	99,37 \pm 1,93	121,20 \pm 2,84
	0,373 \pm 0,00	0,274 \pm 0,01
60d	116,60 \pm 2,17	126,50 \pm 1,35
	0,444 \pm 0,07	0,366 \pm 0,02
90d	367,17 \pm 15,63	124,53 \pm 2,26
	0,979 \pm 0,03	0,262 \pm 0,004

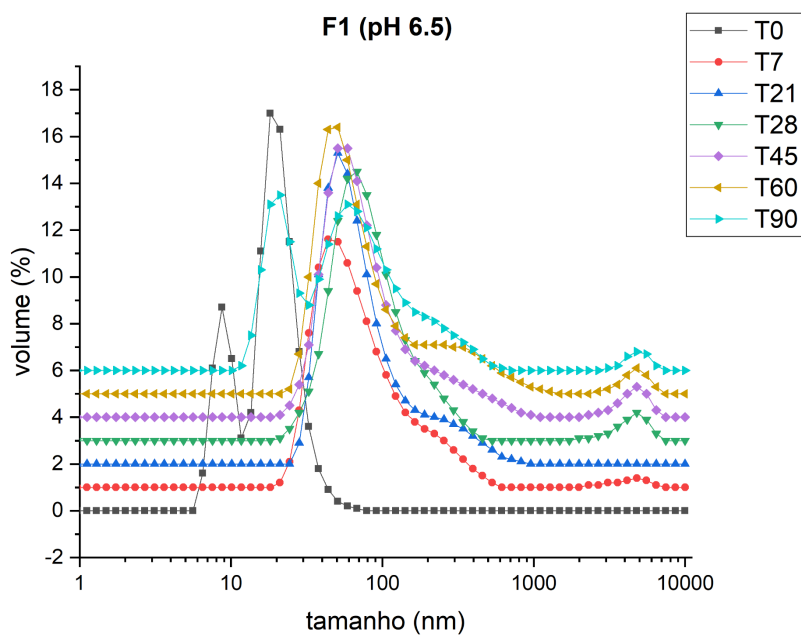
Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Figura 11 - Distribuição do diâmetro das gotas de F1 (pH 11,5) até 90 dias.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Figura 12 - Distribuição do diâmetro das gotas de F1 (pH 6,5) até 90 dias.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Tabela 4 - PZ (\pm DP) e condutividade (\pm DP) ao longo de 90 dias.

Tempo	PZ (mV)		Condutividade (mS/cm)	
	F1 (pH 11,5)	F1 (pH 6,5)	F1 (pH 11,5)	F1 (pH 6,5)
0 d	-45,53 \pm 2,10 ^{aA}	-46,70 \pm 0,87 ^{aA}	0,07 \pm 0,01 ^{aA}	0,04 \pm 0,00 ^{aB}
28 d	-40,03 \pm 0,47 ^{bA}	-43,00 \pm 0,46 ^{bB}	0,04 \pm 0,00 ^{bA}	0,03 \pm 0,00 ^{bB}
60 d	-48,23 \pm 1,12 ^{cA}	-43,80 \pm 0,95 ^{bB}	0,06 \pm 0,00 ^{cA}	0,07 \pm 0,00 ^{cB}
90 d	-56,73 \pm 1,21 ^{dA}	-51,07 \pm 0,76 ^{cB}	0,02 \pm 0,00 ^{dA}	0,04 \pm 0,00 ^{a,B}

Os dados são apresentados como médias \pm DP. As diferenças estatísticas entre as médias foram determinadas pelo teste de faixa múltipla de Tukey e comparações múltiplas de Sidak. Médias dentro da mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas (a-d) são significativamente diferentes ($p < 0,05$), conforme determinado pelo teste de Tukey. Médias dentro da mesma linha seguidas de letras maiúsculas diferentes (A-B) indicam diferenças significativas ($p < 0,01$) conforme determinado pelo teste de Sidak.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Valores absolutos de PZ acima de 30 mV indicam de forma confiável estabilidade em suspensões coloidais, pois a alta carga induz forças repulsivas entre as gotículas de óleo e a nanoemulsão, minimizando a agregação e a desestabilização (Kulkarni *et al.*, 2019). Os resultados mostraram diferenças significativas no PZ das formulações nos diferentes tempos avaliados. Apenas a formulação F1 (pH 6,5) não apresentou alterações na PZ entre 28 e 60 dias. No tempo 0 dias as formulações apresentaram valores de PZ semelhantes, porém ao longo do tempo os valores de PZ foram diferentes quando comparamos as duas formulações. A F1 (pH 6,5) tende a manter um PZ mais consistente ao longo do tempo, enquanto F1 (pH 11,5) apresenta maior variação. Isto indica que o ajuste do pH é importante para a estabilidade do PZ. Apesar de utilizar o surfactante não iônico (APG P818), as nanoemulsões apresentaram PZ negativo, possivelmente devido à adsorção preferencial de íons hidroxila ou substâncias aniônicas no óleo (Stachurski e MichaLek, 1996). Isto sugere que a estabilidade das nanoemulsões depende não apenas do tipo de surfactante, mas também das interações entre o

surfactante e outros componentes da formulação.

A análise estatística revela diferenças significativas na condutividade das formulações F1 (pH 11,5) e F1 (pH 6,5) em diferentes momentos. Contrariamente à observação nos valores de PZ, os valores de condutividade das formulações foram diferentes desde a preparação. F1 (pH 11,5) exhibe consistentemente maior condutividade em comparação com F1 (pH 6,5) em determinados períodos, mas mostra maior variação ao longo do tempo. Por outro lado, F1 (pH 6,5) demonstra condutividade mais estável em pontos específicos, particularmente em 60 dias e 90 dias.

Os resultados mostram que a formulação F1 (pH 6,5) manteve um diâmetro hidrodinâmico médio de gotícula próximo a 120 nm e um Pdl menor que 0,3 por até 90 dias, o que indica uma distribuição de diâmetro de gotícula monodispersa altamente uniforme. Em contrapartida, F1 (pH 11,5) apresentou Pdl superior a 0,3 a partir dos 21 dias, indicando uma transição para a polidispersidade. O aumento no Pdl sugere um alargamento da distribuição do diâmetro das gotas, o que indica que a nanoemulsão em pH 11,5 é menos adequada para aplicações de longo prazo devido à sua tendência à separação de fases e diâmetros de gotas não uniformes. O Pdl mais elevado em condições de pH alcalino pode estar relacionado ao aumento da coalescência das gotículas ou ao fenômeno de maturação de Ostwald, que se tornou mais pronunciado em ambientes menos ácidos (Sun *et al.*, 2023).

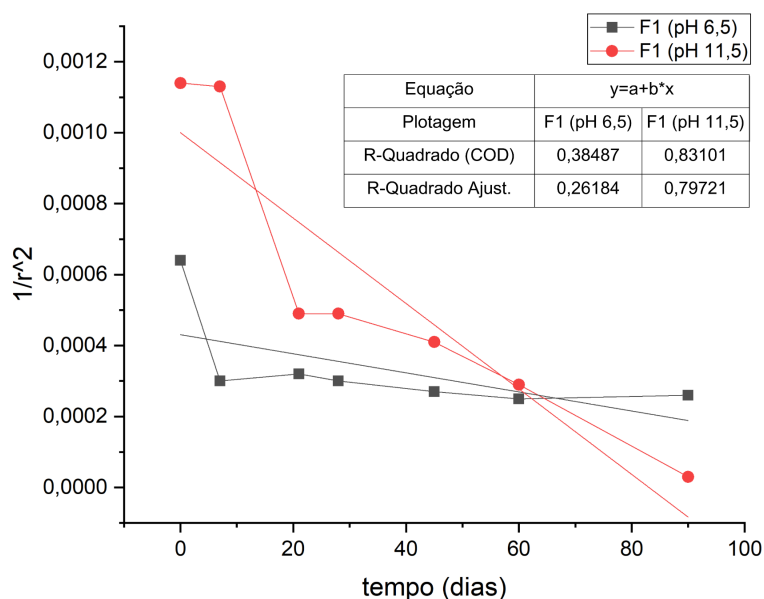
A estabilidade das nanoemulsões depende, em grande parte, do papel desempenhado pelos surfactantes. Esses agentes são responsáveis por promover a miscibilidade entre óleo e água, garantindo que o sistema se mantenha estável ao longo do tempo. Através da redução das tensões interfaciais e da estabilização estérica da fase dispersa, o surfactante cria um filme interfacial resistente que protege contra a coalescência, como descrito por Palazolo *et al.* (2005) e Leong *et al.* (2009).

No entanto, quando o sistema apresenta baixa cobertura das gotículas pelo surfactante ou a presença de um grande número de gotículas na emulsão, a

probabilidade de coalescência aumenta (Nazarzadeh, Anthonympillai e Sajjadi, 2013). Esse fenômeno ocorre quando as gotículas colidem, levando à ruptura do filme interfacial, o que resulta na fusão das gotículas, culminando na formação de uma única gota maior (Kundu *et al.*, 2019). Por outro lado, a maturação de Ostwald, principal mecanismo de instabilidade de nanoemulsões contendo óleos essenciais, embora já mencionado, está vinculado à solubilidade de gotículas dispersas, pois gotículas menores possuem uma solubilidade maior em comparação com as maiores. Com o tempo, a miscibilidade das gotículas com o meio dispersante promove a difusão das moléculas em direção às gotas maiores, resultando no aumento progressivo do diâmetro das gotículas (Musa *et al.*, 2017; Trujillo-Cayado *et al.*, 2020).

A coalescência e a maturação de Ostwald são os principais mecanismos envolvidos no aumento gradual do diâmetro das gotas em sistemas de nanoemulsões ao longo do tempo, impactando diretamente sua estabilidade física (Kundu *et al.*, 2019).

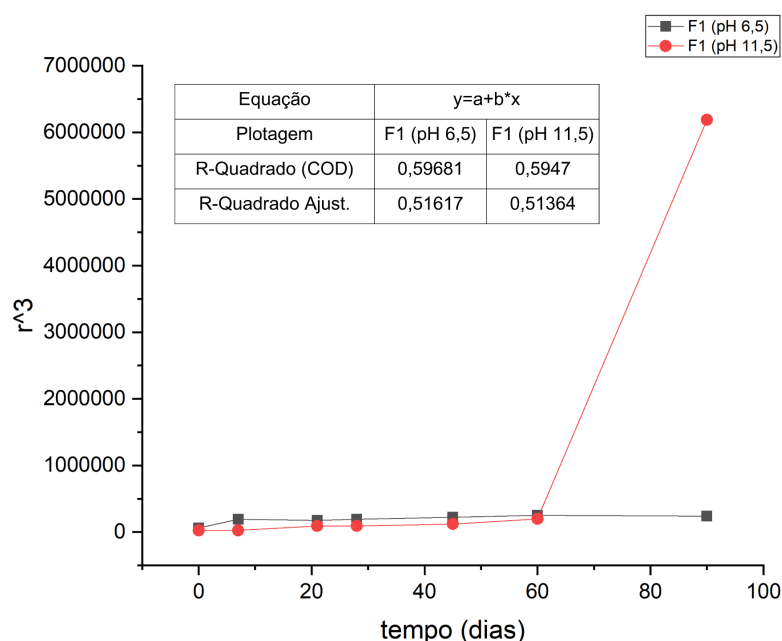
Figura 13 – Gráfico de $1/r^2$ versus tempo de armazenamento para avaliar a taxa de coalescência de F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5), média (n=3).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

A Figura 13 mostra o gráfico de $1/r^2$ em função do tempo de armazenamento para a nanoemulsão F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5). Conforme descrito por Musa *et al.* (2017), um aumento no diâmetro das gotas devido à coalescência resulta em um padrão linear neste gráfico. Os valores de r^2 de 0,3876 para F1 (pH 6,5) e 0,8309 para F1 (pH 11,5) indicam uma correlação linear moderada e forte, respectivamente. Estes resultados sugerem que a coalescência é o principal fenômeno de instabilidade, e a taxa de coalescência é mais consistente e pronunciada em pH mais elevado (11,5), levando a uma relação linear mais forte em comparação com a nanoemulsão em pH 6,5.

Figura 14 – Gráfico de r^3 versus tempo de armazenamento para avaliar o maturação de Ostwald das nanoemulsões F1 e F3, média (n=3).



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Os gráficos de r^3 versus tempo de armazenamento em segundos são usados para determinar a taxa de maturação de Ostwald. A Figura 14 ilustra o gráfico de r^3 versus tempo de armazenamento para nanoemulsão F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5), com valores de r^2 de 0,5968 e 0,5947, respectivamente. Esses valores indicam uma

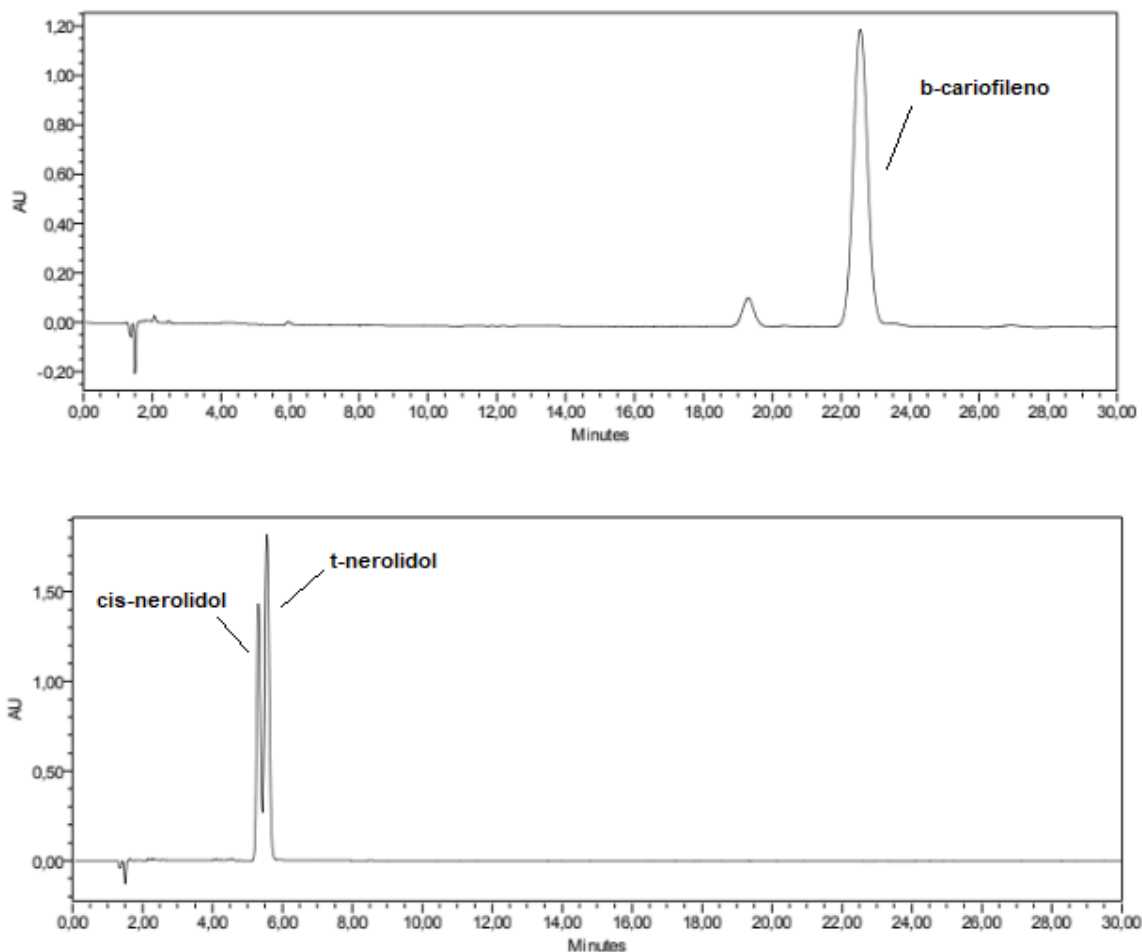
correlação linear moderada, sugerindo que o processo de maturação de Ostwald segue até certo ponto a previsão teórica para ambos os níveis de pH, sendo que, teoricamente, quanto mais próximo o valor de r^2 de 1, mais forte é a correlação linear. No entanto, o teste ANOVA revelou que as diferenças nos valores de r^3 ao longo do tempo entre pH 6,5 e pH 11,5 são estatisticamente significativas em todos os momentos analisados, com valores de p consideravelmente abaixo de 0,05. Esta descoberta destaca que o pH impacta significativamente a taxa de maturação de Ostwald na nanoemulsão.

Estas descobertas enfatizam o papel crítico do pH em influenciar a estabilidade e uniformidade das nanoemulsões. A maior estabilidade observada em pH 6,5 foi caracterizada por baixo valor de Pdl e menores indicativos de coalescência e maturação de Ostwald, sugerindo que condições levemente ácidas são favoráveis para preservar a integridade e uniformidade das nanoemulsões. Por outro lado, o Pdl mais elevado e o aumento da instabilidade observados em pH 11,5 destacam os desafios impostos pelas condições alcalinas, que exacerbam a coalescência das gotículas. Esses conhecimentos são necessários para otimizar as formulações de nanoemulsões em diversas aplicações, incluindo medicamentos, cosméticos e sistemas alimentares, onde a estabilidade a longo prazo e o diâmetro uniforme das gotas são necessários.

5.5.2 Determinação dos teores de β -cariofileno e nerolidol no BDO e nas nanoemulsões

Os resultados obtidos por CLAE confirmaram a presença dos compostos t-nerolidol e β -cariofileno no BDO livre. A identificação desses componentes foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção na região UV com padrões analíticos de referência (Figuras 15 e 16). Além disso, o método analítico desenvolvido mostrou-se eficiente para quantificar esses compostos tanto no BDO livre quanto nas nanoformulações contendo o óleo essencial.

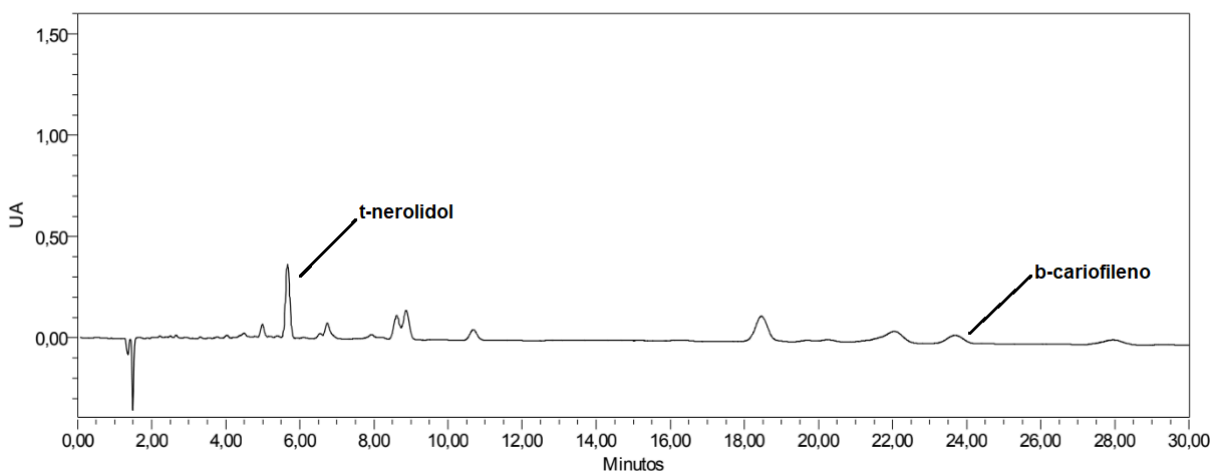
Figura 15 – Cromatogramas das soluções padrão de β -cariofileno e nerolidol analisados em 210 nm na concentração de 1 mg/mL



Perfil cromatográfico dos padrões de β -cariofileno e nerolidol por CLAE-DAD. Comprimento de onda de detecção 210 nm, sistema de eluição isocrático de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético (85:15 v/v), a um fluxo de 1 mL/min, com 20 μ L de injeção.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Figura 16 – Cromatograma do BDO analisado em 210 nm na concentração de 1 mg/mL



Perfil cromatográfico do óleo essencial (BDO) por CLAE-DAD. Comprimento de onda de detecção 210 nm, sistema de eluição isocrático de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético (85:15 v/v), a um fluxo de 1 mL/min, com 20 µL de injeção.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Para quantificar essas substâncias foram obtidas curvas de calibração, β -cariofileno ($y = 39326x + 137278$, $R^2 = 0,9998$) e t -nerolidol ($y = 17909x + 277963$, $R^2 = 0,9966$), que permitiram a quantificação tanto de β -cariofileno quanto de t -nerolidol no óleo. Nossos resultados mostraram que as concentrações obtidas foram de 13,84% para t -nerolidol e 2,68% para β -cariofileno, o que demonstra maior concentração de t -nerolidol do que β -cariofileno em BDO.

Outros estudos realizaram a quantificação e identificação de compostos presentes no BDO por cromatografia gasosa (CG). A pesquisa realizada por Alves *et al.* (2018) confirmou a presença de quantidades significativas de t -nerolidol, sendo o composto majoritário na concentração de 30,62%, e 28 outros compostos, incluindo β -cariofileno na concentração de 5,77% no BDO (Alves *et al.*, 2018). Da mesma forma, os resultados publicados por Monteiro *et al.* (2023) identificaram o t -nerolidol como um dos principais compostos voláteis, representando 12,75% do BDO e β -cariofileno na concentração de 6,43%. Embora esses estudos mostrem valores quantitativos diferentes tanto de β -cariofileno quanto de t -nerolidol no BDO,

eles corroboram nossos resultados e confirmam que o *t*-nerolidol é o principal componente do BDO, com β -cariofileno também presente, porém em menor concentração. A diferença observada nas concentrações pode ser atribuída a variações sazonais, localização geográfica e técnicas de cultivo, conforme evidenciado na literatura, que destaca como fatores ambientais e práticas agrícolas influenciam a composição química dos óleos essenciais (Aćimović *et al.*, 2022; Heikal, 2017; Murakami *et al.*, 2009).

Além do *t*-nerolidol e do β -cariofileno, outros compostos conhecidos estão presentes neste óleo essencial, como limoneno, biciclogermacreno, β -pineno e espatulenol, mostrando seu perfil químico diversificado. Todos estes componentes contribuem significativamente para as características aromáticas e terapêuticas do óleo, destacando a sua importância farmacológica (Alves *et al.*, 2018; Besten *et al.*, 2012; Brandenburg *et al.*, 2020; Maciel Tomazzoli *et al.*, 2024; 2023).

Para avaliar a reprodutibilidade da preparação da nanoemulsão, a formulação F1 (pH 11,5) foi preparada em triplicata, e os teores de β -cariofileno e *t*-nerolidol foram quantificados usando curvas de calibração para β -cariofileno ($y = 39326x + 137278$, $R^2 = 0,9998$) e *t*-nerolidol ($y = 17909x + 277963$, $R^2 = 0,9966$) (Tabela 5).

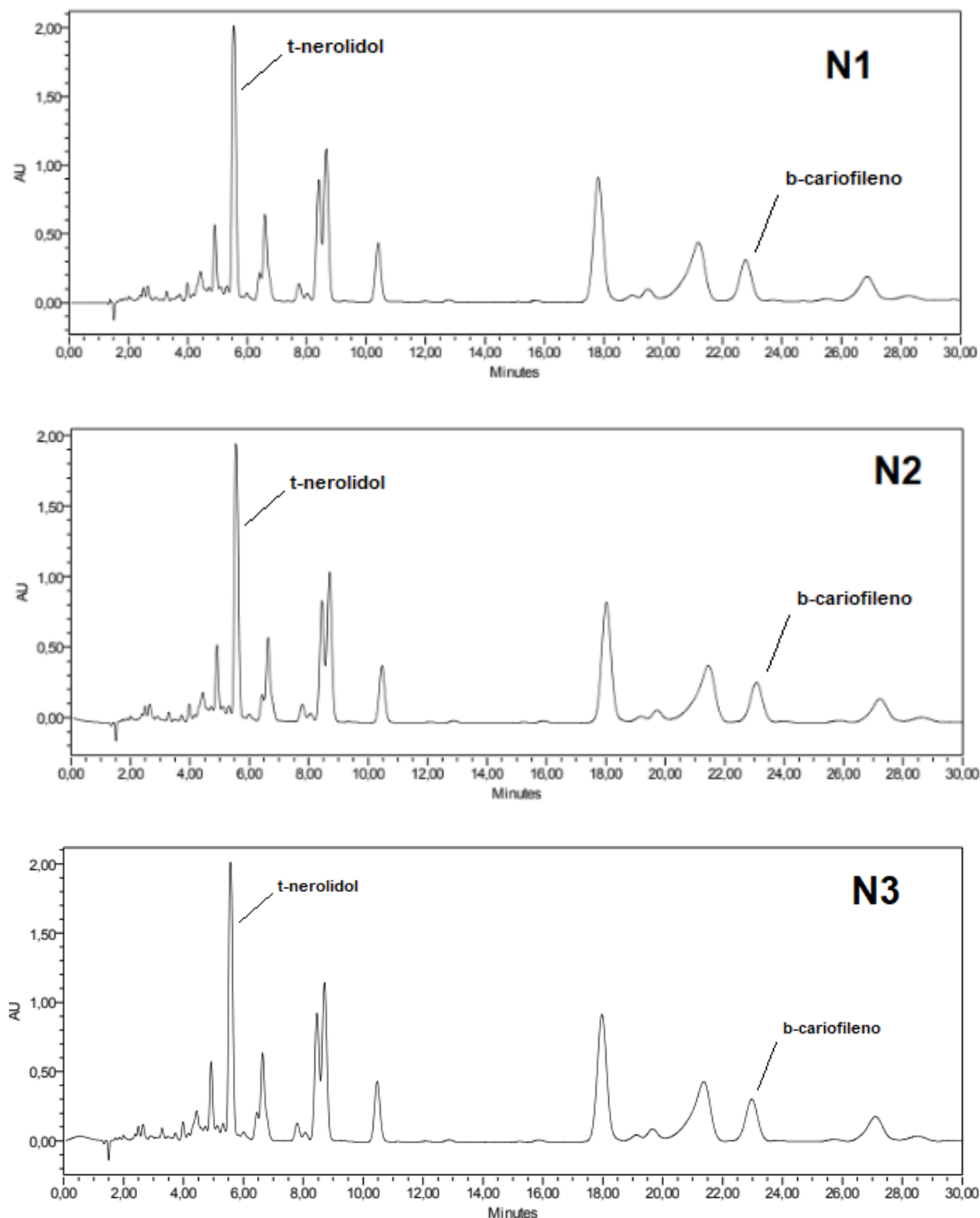
Tabela 5 - Concentrações de β -cariofileno e *t*-nerolidol nas nanoemulsões N1, N2 e N3

Nanoemulsão	Concentração em mg por mL de formulação	
	β -cariofileno	<i>t</i> -nerolidol
N1	7,51	35,71
N2	6,59	34,44
N3	7,62	36,25
Média \pm Desvio Padrão	7,24 \pm 0,50	35,46 \pm 0,90

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Foi calculado o desvio padrão relativo percentual (%RSD) para os teores de β -cariofileno e *t*-nerolidol nas réplicas. O teor médio de β -cariofileno encontrado nas formulações foi de $7,24 \pm 0,50$ mg/mL, com %RSD de 6,9. O teor médio de *t*-nerolidol foi de $35,46 \pm 0,90$ mg/mL, com %RSD de 2,5%. Maior variabilidade foi observada no teor de β -cariofileno em relação ao *t*-nerolidol; entretanto, os resultados demonstram a reprodutibilidade do método de obtenção de nanoemulsões, evidenciado pela uniformidade das concentrações obtidas nas repetições.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos nas análises por CLAE das nanoemulsões N1, N2 e N3 em 210 nm

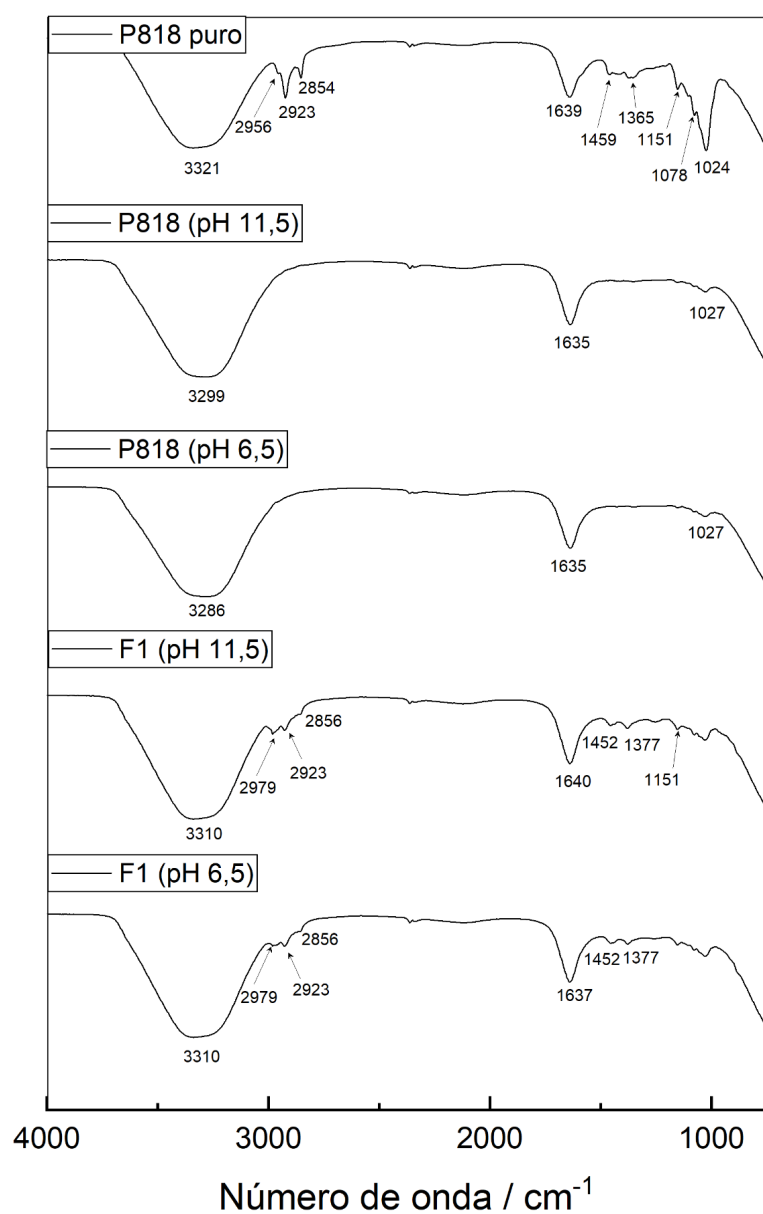


Perfil cromatográfico das réplicas de F1: nanoemulsão N1 (A), N2 (B), N3 (C) por CLAE-DAD. Comprimento de onda de detecção foi 210 nm, sistema de eluição isocrático de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético (85:15 v/v), a um fluxo de 1 mL/min, com 20 µL de injeção.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

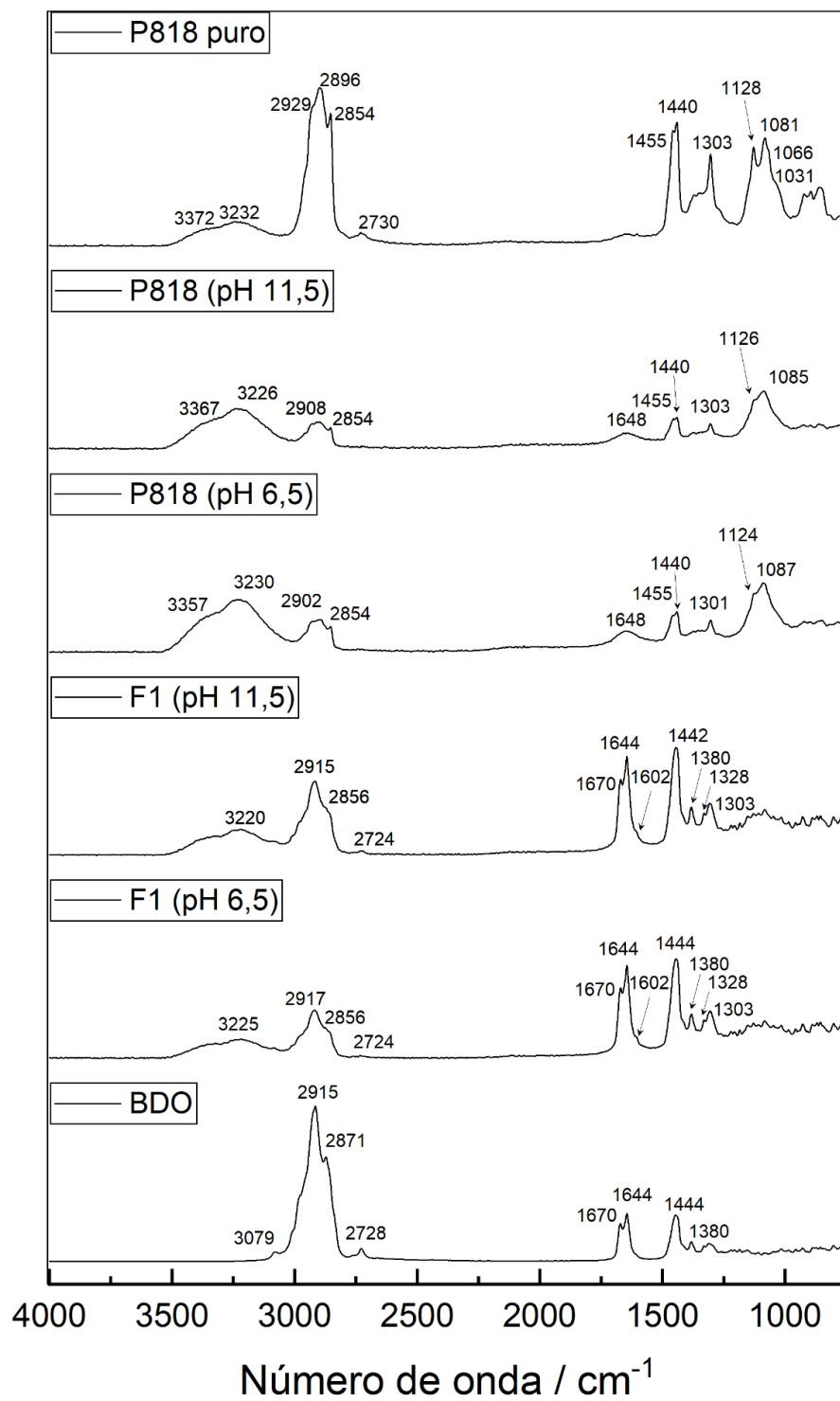
5.5.3 Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Figura 18 - Espectro de FTIR do Surfactante Puro P818, P818 em pH 11,5, P818 em pH 6,5, F1 (pH 11,5), F1 (pH 6,5) e BDO.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Figura 19 - Espectro de Raman do Surfactante Puro P818, P818 em pH 11,5, P818 em pH 6,5, F1 (pH 11,5), F1 (pH 6,5) e BDO.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

As Figuras 18 e 19 apresentam os espectros de FTIR e Raman das nanoemulsões, bem como os do BDO e do surfactante APG P818 em solução, em dois valores de pH diferentes: pH 11,5 (original) e pH 6,5 (ajustado com ácido cítrico). O espectro de FTIR de P818 puro exibiu uma banda entre 1640 e 1635 cm^{-1} relacionada ao grupo alifático CH_2 , e duas outras bandas em 2923 e 2854 cm^{-1} correspondendo ao estiramento CH em $-\text{CH}_2$ e/ou $-\text{CH}_3$ (Abd-Elaty *et al.*, 2024). A absorção característica da ligação éter em APG, resultante da condensação entre os grupos OH da glicose e do álcool graxo, mostra uma banda fraca entre 1120–1170 cm^{-1} , observada em 1151 cm^{-1} no espectro de APG P818 puro (El-Sukkary *et al.*, 2008). Além disso, uma banda larga entre 3286–3310 cm^{-1} pode ser atribuída aos grupos OH, enquanto a banda em 1024 cm^{-1} é característica da ligação CO.

Os espectros Raman de F1 (pH 11,5) e F1 (pH 6,5) sugerem uma diferença na intensidade das bandas associadas à ligação C-C em 2917–2724 cm^{-1} , indicando uma mudança na reorganização da estrutura molecular do surfactante relacionada à cadeia lateral alquil. As outras vibrações discutidas acima nos espectros infravermelhos também podem ser observadas nos espectros Raman. A banda mais intensa nos espectros Raman do P818, observada em aproximadamente 1440 cm^{-1} , pode ser atribuída à ligação CH do grupo alquila presente nos compostos investigados. A presença da banda a aproximadamente 1670 cm^{-1} , observada no espectro das nanoemulsões, está ausente no espectro do surfactante sozinho. Esta banda caracteriza uma banda marcadora para a presença de BDO na formulação e pode ser atribuída à vibração do grupo C=O na estrutura do óleo (Motahari, Mousavi e Haghighi, 2023).

O espectro das nanoemulsões revela uma combinação de todos os componentes individuais mencionados anteriormente. Além disso, não foram observados novos picos, sugerindo a ausência de novas ligações após a nanoencapsulação do BDO e ajuste de pH. Além disso, pode-se inferir que a diferença entre as duas nanoemulsões, devido ao ajuste do pH, pode ser atribuída a uma reorganização da estrutura molecular do surfactante.

5.5.4 Tensão Superficial

No contexto dos surfactantes, é importante distinguir entre tensão superficial e tensão interfacial. A tensão superficial é a força que atua na superfície livre de um líquido, ou seja, para fases líquidas (líquidos puros e misturas líquidas) em contato com um gás ou vapor. Por outro lado, a tensão interfacial refere-se especificamente à interface, onde duas fases líquidas imiscíveis, como óleo e água, estão em contato (Kahl, Wadewitz e Winkelmann, 2003). Neste caso, os surfactantes atuam reduzindo a tensão interfacial, o que facilita a miscibilidade entre esses líquidos.

No caso dos APG, características como o comprimento da cadeia alquílica, o tipo de grupo de cabeça glicosídica e a presença de grupos funcionais influenciam diretamente a tensão interfacial mais do que a tensão superficial (Iglauer *et al.*, 2010). A estrutura dos APG, com grupos glicosídicos hidrofílicos e cadeias alquílicas hidrofóbicas, permite que esses surfactantes se posicionem na interface entre fases líquidas imiscíveis, como óleo e água, e reduzam a tensão interfacial. Essa redução facilita a miscibilidade entre essas fases. A eficiência dos APG na redução da tensão interfacial pode variar de acordo com o comprimento e a saturação das cadeias alquílicas, além do ambiente químico, bem como com fatores químicos do meio, como o pH (Pajić *et al.*, 2017).

Os valores médios de tensão superficial para uma solução de 20% de P818 em pH 6,5 e pH 11,5 foram $28,8 \pm 0,01$ mN/m e $28,94 \pm 0,026$ mN/m, respectivamente. Embora numericamente próximos, a análise ANOVA indicou que as alterações no pH impactam significativamente a tensão superficial do surfactante APG P818. Essa influência pode ser atribuída a mudanças na forma como os APG se organizam na interface óleo-água, o que, por sua vez, afeta a estabilidade das formulações. Por exemplo, essas alterações podem justificar diferenças observadas na estabilidade entre as formulações avaliadas em pH 6,5 e pH 11,5.

Embora existam poucos estudos que avaliaram a tensão superficial de formulações contendo APG, Pajić *et al.* (2017) observaram que APG como decil glucosídeo (Plantacare 2000® UP, BASF, Alemanha) e caprilil/capryl glucosídeo

(Plantacare® 810 UP, BASF, Alemanha) apresentam tensões superficiais mais altas em comparação com surfactantes etoxilados. Essa diferença é atribuída à estrutura particular dos APG, que, apesar de menos eficientes na redução da tensão superficial, demonstram grande eficácia na redução da tensão interfacial. Essa propriedade é essencial para estabilizar emulsões em sistemas óleo-água (Geetha e Tyagi, 2012; Pajić *et al.*, 2017).

Portanto, os resultados deste estudo reforçam que o pH é um fator determinante na modulação da atividade interfacial dos APG, impactando diretamente a estabilidade de formulações. A compreensão desse comportamento é essencial para o desenvolvimento de produtos otimizados, como emulsões farmacêuticas, onde a interação óleo-água desempenha um papel importante na estabilidade, eficácia e liberação controlada dos princípios ativos.

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO POR HET-CAM




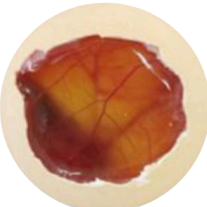
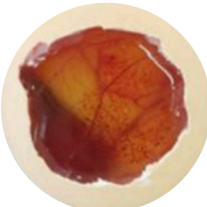
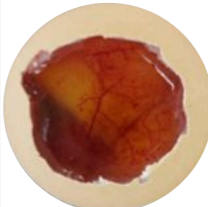
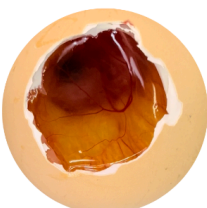
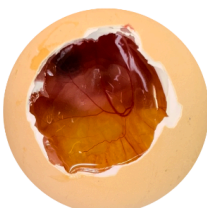
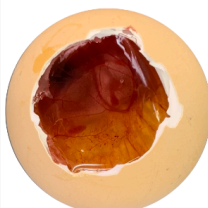
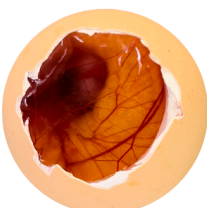
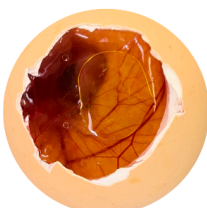
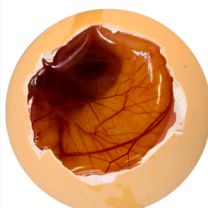

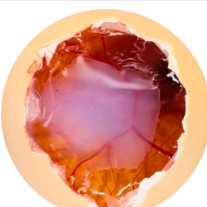
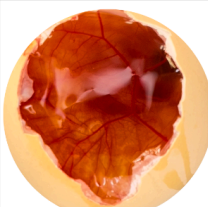


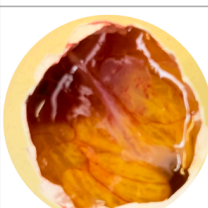
Avaliar o potencial de irritação ocular é importante para garantir a segurança dos indivíduos expostos a uma variedade de produtos farmacêuticos e cosméticos (Araujo Lowndes Viera, *et al.*, 2022). O teste de Draize, amplamente utilizado para esse fim, é controverso devido ao sofrimento dos animais e às limitações significativas, principalmente na interpretação dos resultados, devido às diferenças anatômicas e fisiológicas entre os olhos humanos e de coelho (Luechtefeld *et al.*, 2016). Em contraste, o teste HET-CAM é reconhecido como um método válido, concentrando-se especificamente nos efeitos na conjuntiva, incluindo hiperemia, hemorragia, coagulação e lise, de forma semelhante aos efeitos observados na conjuntiva ocular. Destaca-se pela sua simplicidade, rapidez, facilidade de manuseio e baixo custo. A membrana corioalantóica, utilizada no teste, responde às lesões com processo inflamatório semelhante ao observado na conjuntiva. Nos últimos anos, tem sido utilizado como teste de triagem preliminar para avaliar o potencial irritante de substâncias, com potencial de ser integrado a outros métodos

alternativos para uma melhor predição de toxicidade ocular (Delgado, Cordeiro e Valadares, 2023; Luepke, 1985; Luepke e Kemper, 1986).

A exposição da membrana ao BDO puro apresentou sinais de hemorragia, sendo classificada como moderadamente irritante ($IS = 5,0 \pm 0$). Entretanto, o BDO no azeite (1:1) não apresentou sinais de hemorragia, coagulação ou hiperemia/lise, sendo classificado como não irritante ($IS = 0,0 \pm 0$). Como esperado, o NaCl 0,9% não apresentou reação na membrana, sendo classificado como não irritante ($IS = 0,0 \pm 0$), enquanto o NaOH 0,1M foi classificado como altamente irritante ($IS = 18,04 \pm 0,08$) (Figura 20).

Neste estudo, as formulações nanoencapsuladas foram classificadas como irritantes leves: F1 (pH 6,5) e F1 (pH 11,5) apresentaram $IS = 3,0 \pm 0$ e $IS = 3,6 \pm 1,15$, respectivamente. Em comparação com o óleo essencial em sua forma pura, que obteve IS moderado ($5,0 \pm 0$), as formulações encapsuladas demonstraram redução significativa do potencial irritante. Observa-se também que o potencial de irritação da formulação em pH 11,5 ($IS = 3,6 \pm 1,15$) foi superior ao da mesma formulação ajustada para pH 6,5 ($IS = 3,0 \pm 0$), destacando a importância do controle do pH para valores compatíveis com o pH cutâneo. Assim, a combinação entre nanoencapsulação e ajuste de pH surge como uma estratégia eficaz para reduzir o potencial irritante de ativos naturais em formulações cosméticas.

Figura 20 - Imagens do HET-CAM na presença de soluções, escore de irritação e classificação de irritação no HET-CAM (n = 3). IS: escore de irritação; \pm DP: desvio padrão.

Substância	Tempo (s)			IS (\pm DP)	Classificação
	T=0	T=20	T=300		
0,9% NaCl				0,0 \pm 0	Não irritante
0,1 M NaOH				18,04 \pm 0,08	Irritante grave
BDO Puro				5,0 \pm 0	Irritante moderado
BDO:Azeite de oliva (1:1)				0,0 \pm 0	Não irritante
F1 (pH 6,5)				3,0 \pm 0	Irritante leve
F1 (pH 11,5)				3,6 \pm 1,15	Irritante leve

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Os surfactantes podem afetar a barreira lipídica natural da pele e da córnea, aumentando potencialmente a irritação cutânea, reduzindo a função da barreira e contribuindo para sinais de envelhecimento prematuro da pele (Pantelic e Cuckovic, 2014). Estas considerações são importantes ao selecionar surfactantes para formulações destinadas ao uso tópico.

O surfactante utilizado neste estudo foi o P818, um APG reconhecido por sua suavidade e baixa irritabilidade. Essa classe de surfactantes é amplamente utilizada em produtos para a pele, inclusive aqueles desenvolvidos para bebês e para a área dos olhos (Fiume *et al.*, 2013). Estudos anteriores, como o realizado por Mehling *et al.* (2007), avaliaram o P818, calculando o quociente de irritação (Q) em relação ao padrão Texapon ASV por meio do teste HET-CAM. Os pesquisadores ajustaram o pH do surfactante para 6,5 e a concentração para 3%, diluindo-o em água, o que resultou em um $Q = 0,4$. As classificações baseadas no Q foram estabelecidas da seguinte forma: $\leq 0,8$: levemente irritante; $> 0,8$ a $< 1,2$: moderadamente irritante; $\geq 1,2$ a $< 2,0$: irritante; e $\geq 2,0$: severamente irritante. Assim, o P818 foi classificado como levemente irritante, pois na metodologia adotada pelos autores, a categoria "não irritante" não foi considerada. Eles enfatizam a importância do ajuste do pH e da concentração do surfactante nas formulações para garantir a suavidade do produto, dada a relevância desses parâmetros na redução do potencial de irritação da pele (Mehling, Kleber e Hensen, 2007). Portanto, a formulação contendo o BDO, ajustada para pH 6,5 apresentou leve irritação, sugerindo sua adequação potencial para uso tópico na exploração dos benefícios terapêuticos deste óleo essencial.

6. CONCLUSÕES

Este estudo desenvolveu uma nanoemulsão inovadora livre de PEG utilizando um surfactante APG para encapsular BDO, visando promover uma potencial formulação para a reparação da pele. A análise por CLAE do BDO revelou a presença de 13,84% de *t*-nerolidol e 2,68% de β -cariofileno, compostos conhecidos por suas propriedades ativas. O BDO apresentou citotoxicidade em fibroblastos humanos apenas em concentrações superiores a 500 $\mu\text{g/mL}$ e demonstrou potencial para acelerar a cicatrização de feridas, induzindo aumento da migração celular. As nanoemulsões desenvolvidas, com proporção de surfactante/óleo de 1:1, exibiram estabilidade e uniformidade superiores, quanto à distribuição de diâmetro de gotículas. Um resultado que se destaca neste estudo foi a demonstração do comportamento sensível ao pH dos surfactantes APG, que permanece pouco explorado na ciência farmacêutica. Condições levemente ácidas favoreceram a integridade e uniformidade das nanoemulsões, enquanto o pH alcalino comprometeu sua estabilidade, indicando a ocorrência de coalescência. As análises espectroscópicas por Raman e FTIR confirmaram a reorganização estrutural da cadeia alquílica do surfactante APG em diferentes níveis de pH, destacando a importância do controle de pH para a integridade das nanoemulsões. Além disso, a formulação ajustada para pH 6,5 apresentou menor potencial de irritação, conforme evidenciado pelos testes de HET-CAM, reforçando seu potencial para aplicações seguras em produtos tópicos.

As principais contribuições acadêmicas deste estudo incluem a exploração do comportamento sensível ao pH dos surfactantes APG e a fundamentação para o desenvolvimento de nanoemulsões tópicas mais eficazes e seguras, com aplicações potenciais em tratamentos dermatológicos. Essas descobertas fornecem uma base promissora para o avanço da ciência das nanoemulsões. No entanto, é importante reconhecer as limitações da pesquisa, como a necessidade de investigações adicionais sobre a eficácia da formulação contendo o BDO no reparo da pele. Para futuras pesquisas, sugere-se explorar a aplicação das nanoemulsões em modelos *in vivo* para avaliar a efetividade da cicatrização de feridas. Com isso,

espera-se que os achados deste estudo sirvam como uma base promissora para o desenvolvimento de inovações na área de dermatologia.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELATY, D. M.; ISHAK, R. A. H.; OSMAN, R.; GENEIDI, A. S. Engineering a novel water-in-oil biocompatible microemulsion system for the ocular delivery of dexamethasone sodium phosphate in the treatment of acute uveitis. **International journal of pharmaceutics**, v. 650, p. 123704, 25 jan. 2024.
- ACIMOVIĆ, M.; ZEREMSKI, T.; ŠOVLJANSKI, O.; LONČAR, B.; PEZO, L.; ZHELJAZKOV, V. D.; PEZO, M.; ŠUPUT, D.; KURUNCI, Z. Seasonal variations in essential oil composition of immortelle cultivated in Serbia. **Horticulturae**, v. 8, n. 12, p. 1183, 11 dez. 2022.
- ALAM, P.; ANSARI, M. J.; ANWER, M. K.; RAISH, M.; KAMAL, Y. K. T.; SHAKEEL, F. Wound healing effects of nanoemulsion containing clove essential oil. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 591–597, maio 2017.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 405, 11 out. 2020.
- ALVES, K. F.; CAETANO, F. H.; PEREIRA GARCIA, I. J.; SANTOS, H. L.; SILVA, D. B.; SIQUEIRA, J. M.; TANAKA, A. S.; ALVES, S. N. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Environmental science and pollution research international**, v. 25, n. 31, p. 31718–31726, nov. 2018.
- ALVES-SILVA, J. M.; MACCIONI, D.; COCCO, E.; GONÇALVES, M. J.; PORCEDDA, S.; PIRAS, A.; CRUZ, M. T.; SALGUEIRO, L.; MAXIA, A. Advances in the phytochemical characterisation and bioactivities of *Salvia aurea* L. essential oil. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1247, 9 mar. 2023.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 5, p. 978–985, maio 2011.
- ARAUJO LOWNDES VIERA, L. M. DE; SILVA, R. S.; SILVA, C. C. DA; PRESGRAVE, O. A. F.; BOAS, M. H. S. V. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 78, p. 105255, fev. 2022.
- ASADINEZHAD, S.; KHODAIYAN, F.; SALAMI, M.; HOSSEINI, H.; GHANBARZADEH, B. Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 1 dez. 2019.
- AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; IQBAL, Z.; KHAR, R. K.; AQIL, M.;

TALEGAONKAR, S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 69–76, 1 mar. 2009.

AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F.; KHAR, R.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S. Components screening and influence of surfactant and cosurfactant on nanoemulsion formation. **Current nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 220–226, 1 maio 2009.

AZZI, J.; DANJOU, P.-E.; LANDY, D.; RUELLAN, S.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. The effect of cyclodextrin complexation on the solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of cabreuva essential oil. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 13, n. 1, p. 835–844, 5 maio 2017.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P. H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 2, p. 215–223, fev. 2017.

BARRADAS, T. N.; CAMPOS, V. E. B. DE; SENNA, J. P.; COUTINHO, C. DOS S. C.; TEBALDI, B. S.; SILVA, K. G. DE H. E.; MANSUR, C. R. E. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, v. 480, p. 214–221, 5 set. 2015.

BARRADAS, T. N.; HOLANDA E SILVA, K. G. DE. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. **Environmental chemistry letters**, v. 19, n. 2, p. 1153–1171, 1 abr. 2021.

BARROSO, G. M. Compositae--the subtribe Baccharidinae Hoffmann (a study of the species occurring in Brazil). **Rodriguesia Rio de Janeiro**, 1976.

BARROS SILVA SOARES DE SOUZA, E. P.; TRINDADE, G. DAS G. G.; LINS DANTAS GOMES, M. V.; SANTOS SILVA, L. A.; GRESPAN, R.; QUINTANS JUNIOR, L. J.; CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L.; SHANMUGAN, S.; ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO, A. Anti-inflammatory effect of nano-encapsulated nerolidol on zymosan-induced arthritis in mice. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 135, p. 110958, jan. 2020.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-biological interactions**, v. 245, p. 50–58, 5 fev. 2016.

BEALL, H. D.; SLOAN, K. B. Topical delivery of 5-fluorouracil (5-FU) by 1,3-bisalkylcarbonyl-5-FU prodrugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 231, n. 1, p. 43–49, 1 jan. 2002.

BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for

human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 18 ago. 2018.

BESTEN, M. A.; JASINSKI, V. C. G.; COSTA, Â. DE G. L. C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L.; RIVA, D.; DALMARCO, J. B.; GRANATO, D. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1041–1047, jun. 2012.

BEYENE, R. T.; DERRYBERRY, S. L., Jr; BARBUL, A. The effect of comorbidities on wound healing. **The Surgical clinics of North America**, v. 100, n. 4, p. 695–705, 1 ago. 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential: What they are and what they are not? **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.

BONIN, E.; CARVALHO, V. M.; AVILA, V. D.; APARECIDA DOS SANTOS, N. C.; BENASSI-ZANQUETA, É.; CONTRERAS LANCHEROS, C. A.; SANTOS PREVIDELLI, I. T.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALVES DE ABREU FILHO, B.; NUNES DO PRADO, I. *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 120, n. 108920, p. 108920, 1 fev. 2020.

BORNES, L.; WINDOFFER, R.; LEUBE, R. E.; MORGNER, J.; RHEENEN, J. VAN. Scratch-induced partial skin wounds re-epithelialize by sheets of independently migrating keratinocytes. **Life science alliance**, v. 4, n. 1, p. e202000765, 1 jan. 2021.

BRANDENBURG, M. D. M. **Atividade anti-inflamatória tópica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (asteraceae) em modelos de inflamação de pele.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2020.

BRANDENBURG, M. M.; ROCHA, F. G.; PAWLOSKE, P. L.; SOLEY, B. DA S.; ROCKENBACH, A.; SCHARF, D. R.; HEIDEN, G.; ASCARI, J.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 259, n. 112840, p. 112840, 15 set. 2020.

BRUUSGAARD-MOURITSEN, M. A.; JOHANSEN, J. D.; GARVEY, L. H. Clinical manifestations and impact on daily life of allergy to polyethylene glycol (PEG) in ten patients. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 51, n. 3, p. 463–470, mar. 2021.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91 Suppl 3, n. suppl 3, p. e20190105, 3 jun. 2019.

CAZELLA, L. N.; GLAMOCLIJ, J.; SOKOVIĆ, M.; GONÇALVES, J. E.; LINDE, G.

A.; COLAUTO, N. B.; GAZIM, Z. C. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 27, 29 jan. 2019.

CEDROLA, C. C.; BARBOSA, F. G.; MARCELINO, P. R. F.; SILVA, N. P.; TAVARES1, G. D.; BARRADAS, T. N.; SILVA, S. S.; VILELA, F. M. P. Unlocking the beauty benefits: Exploring biosurfactants from *Scheffersomyces shehatae* for cosmetics. **J Surfact Deterg**, 14 jan. 2024.

CHAN, W.-K.; TAN, L. T.-H.; CHAN, K.-G.; LEE, L.-H.; GOH, B.-H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, 28 abr. 2016.

CHEN, M.; CHANG, C.; LEVIAN, B.; WOODLEY, D. T.; LI, W. Why are there so few FDA-approved therapeutics for wound healing? **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 20, p. 15109, 12 out. 2023.

CHEW, P. Y.; REINHARDT, A. Phase diagrams-Why they matter and how to predict them. **The Journal of chemical physics**, v. 158, n. 3, p. 030902, 21 jan. 2023.

CHHABRA, J.; CHOPRA, H.; PAHWA, R.; RAINA, N.; WADHWA, K.; SAINI, S.; NEGI, P.; GUPTA, M.; SINGH, I.; DUREJA, H.; EMRAN, T. B. Potential of nanoemulsions for accelerated wound healing: innovative strategies. **International journal of surgery (London, England)**, v. 109, n. 8, p. 2365–2377, 1 ago. 2023.

CHOI, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals: strategies for improving their formulation, stability, functionality and bioavailability. **Food science and biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 149–168, fev. 2020.

CIMINO, C.; MAUREL, O. M.; MUSUMECI, T.; BONACCORSO, A.; DRAGO, F.; SOUTO, E. M. B.; PIGNATELLO, R.; CARBONE, C. Essential oils: Pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 3 mar. 2021.

CORNWELL, P. A.; BARRY, B. W. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 261–269, abr. 1994.

CORTÉS, H.; HERNÁNDEZ-PARRA, H.; BERNAL-CHÁVEZ, S. A.; PRADO-AUDELO, M. L. D.; CABALLERO-FLORÁN, I. H.; BORBOLLA-JIMÉNEZ, F. V.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; MAGAÑA, J. J.; LEYVA-GÓMEZ, G. Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. **Materials**, v. 14, n. 12, p. 3197, 10 jun. 2021.

COSTA, P.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; CURY, B. J.; ESPÍNDOLA, V. L.; FRANÇA, T. C. S.; ALMEIDA, M. O. DE; ARRUDA, C.; BASTOS, J. K.; SILVA, L. M. DA; ANDRADE, S. F. DE. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **BioFactors**, v. 45, n. 3, p. 479–489, maio 2019.

CRIOLLO-MENDOZA, M. S.; CONTRERAS-ANGULO, L. A.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; JIMÉNEZ-ORTEGA, L. A.; HEREDIA, J. B. Wound healing properties of natural products: Mechanisms of action. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 2, p. 598, 6 jan. 2023.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; IQBAL, M. A.; AHAMED, M. B. K.; EZZAT, M. O.; MAJID, A. S. A.; MAJID, A. M. S. A. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 26 jun. 2015.

DAHMANA, N.; MUGNIER, T.; GABRIEL, D.; FAVEZ, T.; KOWALCZUK, L.; BEHAR-COHEN, F.; GURNY, R.; KALIA, Y. N. Polymeric micelle mediated follicular delivery of spironolactone: Targeting the mineralocorticoid receptor to prevent glucocorticoid-induced activation and delayed cutaneous wound healing. **International journal of pharmaceutics**, v. 604, n. 120773, p. 120773, 15 jul. 2021.

DE GENNES, P. G.; TAUPIN, C. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. **The journal of physical chemistry**, v. 86, n. 13, p. 2294–2304, jun. 1982.

DELGADO, F. I.; CORDEIRO, R. G. L.; VALADARES, C. M. **Atlas do método HET-CAM: protocolo ilustrado aplicado à avaliação da toxicidade ocular**, 2023. Disponível em: <<https://educare.fiocruz.br/resource/show?id=VswuyIV1>>. Acesso em: 12 nov. 2024

DENG, L.; DU, C.; SONG, P.; CHEN, T.; RUI, S.; ARMSTRONG, D. G.; DENG, W. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, n. 1, p. 8852759, 4 fev. 2021.

DE, S.; MALIK, S.; GHOSH, A.; SAHA, R.; SAHA, B. A review on natural surfactants. **RSC advances**, v. 5, n. 81, p. 65757–65767, 31 jul. 2015.

DHOOT, A. S.; NAHA, A.; PRIYA, J.; XALXO, N. Phase Diagrams for Three Component Mixtures in Pharmaceuticals and its Applications. **Journal of Young Pharmacists**, 1 abr. 2018.

DI GIACOMO, S.; DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; WINK, M. Chemosensitizing properties of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide in combination with doxorubicin in human cancer cells. **Anticancer research**, v. 37, n. 3, p. 1191–1196, mar. 2017.

DOMINGOS NETO, B.; MEDALHA COLTURATO, V. M.; SICCI DEL LAMA, D.; SILVA BARUD, H. DA; ROSAS DA COSTA IEMMA, M. Baccharis dracunculifolia extract as a promising active for healing chronic wounds. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB**, v. 5, n. 2, p. 2–7, 1 set. 2023.

EBERLEIN-KÖNIG, B.; SCHÄFER, T.; HUSS-MARP, J.; DARSOW, U.; MÖHRENSCHLAGER, M.; HERBERT, O.; ABECK, D.; KRÄMER, U.; BEHRENDT, H.; RING, J. Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss

and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. **Acta dermato-venereologica**, v. 80, n. 3, p. 188–191, maio 2000.

ELMESHAD, A. N.; TADROS, M. I. Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglycosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 1–9, mar. 2011.

EL-SUKKARY, M. M. A.; SYED, N. A.; AIAD, I.; EL-AZAB, W. I. M. Synthesis and Characterization of some Alkyl Polyglycosides Surfactants. **Journal of surfactants and detergents**, v. 11, n. 2, p. 129–137, 1 jul. 2008.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; M., B. M. L.; E., S. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v. 13, n. 2, p. 183–189, 2011.

FARNSWORTH, N. R. The role of ethnopharmacology in drug development. **Ciba Foundation symposium**, v. 154, p. 2–11; discussion 11–21, 1990.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 73–80, nov. 2003.

FERNANDES, G. W.; OKI, Y.; BELMIRO, M. S.; RESENDE, F. M.; CORRÊA JUNIOR, A.; AZEVEDO, J. L. DE. Multitrophic interactions among fungal endophytes, bees, and *Baccharis dracunculifolia*: resin tapering for propolis production leads to endophyte infection. **Arthropod-plant interactions**, v. 12, n. 3, p. 329–337, 1 jun. 2018.

FERREIRA, M. O. G.; LEITE, L. L. R.; LIMA, I. S. DE; BARRETO, H. M.; NUNES, L. C. C.; RIBEIRO, A. B.; OSAJIMA, J. A.; SILVA FILHO, E. C. DA. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 409–418, 5 nov. 2016.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224–230, jun. 2007.

FIUME, M. M. *et al.* Safety assessment of decyl glucoside and other alkyl glucosides as used in cosmetics. **International journal of toxicology**, v. 32, n. 5 Suppl, p. 22S–48S, Sep-Oct 2013.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas**

Medicinais, v. 17, n. 1, p. 45–50, 2015.

FRYDMAN, G. H.; OLALEYE, D.; ANNAMALAI, D.; LAYNE, K.; YANG, I.; KAAFARANI, H. M. A.; FOX, J. G. Manuka honey microneedles for enhanced wound healing and the prevention and/or treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) surgical site infection. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 13229, 6 ago. 2020.

FUENTES, K.; MATAMALA, C.; MARTÍNEZ, N.; ZÚÑIGA, R. N.; TRONCOSO, E. Comparative Study of Physicochemical Properties of Nanoemulsions Fabricated with Natural and Synthetic Surfactants. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 2002, 9 nov. 2021.

GAMIA, M. T.; RIBOSA, I.; CAMPOS, E.; SANCHEZ LEAL, J. Ecological properties of alkylglucosides. **Chemosphere**, v. 35, n. 3, p. 545–556, 1 ago. 1997.

GAO, W.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 127, p. 46–57, 1 mar. 2018.

GAZIM, Z. C.; VALLE, J. S.; CARVALHO DOS SANTOS, I.; RAHAL, I. L.; SILVA, G. C. C.; LOPES, A. D.; RUIZ, S. P.; FARIA, M. G. I.; PIAU JUNIOR, R.; GONÇALVES, D. D. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE). **Frontiers in pharmacology**, v. 13, 2022.

GEETHA, D.; TYAGI, R. Alkyl poly glucosides (APGs) surfactants and their properties: A review. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 49, n. 5, p. 417–427, 1 set. 2012.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 1 jul. 2008.

GOMES, V. M.; NEGREIROS, D.; CARVALHO, V.; FERNANDES, G. W. Crescimento e desempenho de espécies nativas de campo rupestre em áreas degradadas quartzíticas. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 10, n. 3, p. 159–168, 2015.

GRAVES, N.; ZHENG, H. Modelling the direct health care costs of chronic wounds in Australia. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association**, 2014.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 5 mar. 2010.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 21 mar. 2016.

GUPTA, S. S.; SINGH, O.; BHAGEL, P. S.; MOSES, S.; SHUKLA, S.; MATHUR, R. K. Honey dressing versus silver sulfadiazene dressing for wound healing in burn

patients: a retrospective study. **Journal of cutaneous and aesthetic surgery**, v. 4, n. 3, p. 183–187, set. 2011.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008.

GUSHIKEN, L. F. S. *et al.* Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, p. 9004014, 3 fev. 2022.

HARRIS-TRYON, T. A.; GRICE, E. A. Microbiota and maintenance of skin barrier function. **Science**, v. 376, n. 6596, p. 940–945, 27 maio 2022.

HEIKAL, A. A.-E. M. Variation in the Essential Oil Content and its Composition in Eucalyptus cinerea Leaves and its Relation to Some Environmental Factors. **Journal of essential oil-bearing plants**, v. 20, n. 4, p. 995–1005, 4 jul. 2017.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International journal of pharmaceutics**, v. 370, n. 1-2, p. 181–186, 31 mar. 2009.

ICCVAM. **Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method**. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>: [s.n.].

IGLAUER, S.; WU, Y.; SHULER, P.; TANG, Y.; GODDARD, W. A., III. Analysis of the influence of alkyl polyglycoside surfactant and cosolvent structure on interfacial tension in aqueous formulations versus n-octane. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 47, n. 2, p. 87–97, 1 mar. 2010.

JHAWAT, V.; GULIA, M.; SHARMA, A. K. Chapter 15 - Pseudoternary phase diagrams used in emulsion preparation. *Em*: SHARMA, N.; OJHA, H.; RAGHAV, P. K.; GOYAL, R. K. (Eds.). **Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences**. [s.l.] Academic Press, 2021. p. 455–481.

JIA, Y.; GAN, Y.; HE, C.; CHEN, Z.; ZHOU, C. The mechanism of skin lipids influencing skin status. **Journal of dermatological science**, v. 89, n. 2, p. 112–119, fev. 2018.

JOHNSON, P.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; PINFIELD, V. J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in colloid and interface science**, v. 288, n. 102340, p. 102340, 1 fev. 2021.

KAHL, H.; WADEWITZ, T.; WINKELMANN, J. Surface tension and interfacial tension of binary organic liquid mixtures. **Journal of chemical and engineering data**, v. 48, n. 6, p. 1500–1507, 1 nov. 2003.

KAISER, P.; WÄCHTER, J.; WINDBERGS, M. Therapy of infected wounds: overcoming clinical challenges by advanced drug delivery systems. **Drug delivery**

and translational research, v. 11, n. 4, p. 1545–1567, 20 ago. 2021.

KAKADIA, P. G.; CONWAY, B. R. Design and development of essential oil based nanoemulsion for topical application of triclosan for effective skin antisepsis.

Pharmaceutical development and technology, v. 27, n. 5, p. 554–564, 28 jun. 2022.

KANJI, S.; DAS, H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 5217967, 29 out. 2017.

KAPP, S.; MILLER, C.; SANTAMARIA, N. The quality of life of people who have chronic wounds and who self-treat. **Journal of clinical nursing**, v. 27, n. 1-2, p. 182–192, 1 jan. 2018.

KARSAK, M. *et al.* Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. **Science**, v. 316, n. 5830, p. 1494–1497, 8 jun. 2007.

KECK, C. M.; KOVAČEVIĆ, A.; MÜLLER, R. H.; SAVIĆ, S.; VULETA, G.; MILIĆ, J. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): the value of different alkyl polyglucoside surfactants. **International journal of pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p. 33–41, 20 out. 2014.

KK, A.; RANI, S.; CHETNA, V.; SATHEESAN, A.; AR, N.; KARIYIL, B. J.; ANOOPRAJ; UMA. Comprehensive investigation of beta-caryophyllene for wound healing potential: In silico docking on key targets and in vitro evaluation on mouse fibroblast cell line. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 9, n. 1, p. 1451–1456, 1 jan. 2024.

KOLIMI, P.; NARALA, S.; NYAVANANDI, D.; YOUSSEF, A. A. A.; DUDHIPALA, N. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: Trajectory and recent advancements. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 15, p. 2439, 6 ago. 2022.

KORDESTANI, S. S. Wound Classification. *Em: Atlas of Wound Healing*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 49–50.

KOYAMA, S.; PURK, A.; KAUR, M.; SOINI, H. A.; NOVOTNY, M. V.; DAVIS, K.; KAO, C. C.; MATSUNAMI, H.; MESCHER, A. Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. **PloS one**, v. 14, n. 12, p. e0216104, 16 dez. 2019.

KULKARNI, N.; RANPISE, N.; RATHORE, D.; DHOLE, S. Characterization of self-microemulsifying dosage form: Special emphasis on zeta potential measurement. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 10, n. 3, p. 172–179, 2019.

KUNDU, P.; ARORA, K.; GU, Y.; KUMAR, V.; MISHRA, I. M. Formation and stability of water-in-oil nano-emulsions with mixed surfactant using in-situ combined condensation-dispersion method. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 97, n. 7, p. 2039–2049, jul. 2019.

LAPCZYNSKI, A.; BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material

review on nerolidol (isomer unspecified). **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 11, p. S247–50, nov. 2008.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 45, 2000.

LEE, S.-J.; HAN, J.-I.; LEE, G.-S.; PARK, M.-J.; CHOI, I.-G.; NA, K.-J.; JEUNG, E.-B. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 1, p. 184–188, jan. 2007.

LÉMERY, E.; BRIANÇON, S.; CHEVALIER, Y.; BORDES, C.; ODDOS, T.; GOHIER, A.; BOLZINGER, M.-A. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.

LEMOES, M.; DE BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; FILHO, A. A. DA S.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity†. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 603–608, 18 fev. 2010.

LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721–727, ago. 2009.

LEONIDA, M. D.; KUMAR, I. Wound healing and skin regeneration. *Em: SpringerBriefs in Bioengineering*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 17–25.

LIFSHITZ, I. M.; SLYOZOV, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. **The Journal of physics and chemistry of solids**, v. 19, n. 1-2, p. 35–50, 1 abr. 1961.

LI, M. K.; FOGLER, H. S. Acoustic emulsification. Part 2. Breakup of the large primary oil droplets in a water medium. **Journal of fluid mechanics**, v. 88, n. 3, p. 513–528, 13 out. 1978.

LINDMAN, B.; SHINODA, K.; OLSSON, U.; ANDERSON, D.; KARLSTRÖM, G.; WENNERSTRÖM, H. On the demonstration of bicontinuous structures in microemulsions. **Colloids and surfaces**, v. 38, n. 1, p. 205–224, 1 jan. 1989.

LIU, L. *et al.* Functional nano-systems for transdermal drug delivery and skin therapy. **Nanoscale advances**, v. 5, n. 6, p. 1527–1558, 14 mar. 2023.

LIU, T.; CHEN, X. Bioactive compounds from natural sources: Discovery, evaluation, and applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 13, p. 3209, 5 jul. 2024.

LUECHTEFELD, T.; MAERTENS, A.; RUSSO, D. P.; ROVIDA, C.; ZHU, H.; HARTUNG, T. Analysis of Draize eye irritation testing and its prediction by mining publicly available 2008-2014 REACH data. **ALTEX**, v. 33, n. 2, p. 123–134, 11 fev.

2016.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 23, n. 2, p. 287–291, fev. 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 24, n. 6, p. 495–496, 1 jun. 1986.

LUKIC, M.; FILIPOVIC, M.; PAJIC, N.; LUNTER, D.; BOZIC, D.; SAVIC, S. Formulation of topical acidic products and acidification of the skin - Contribution of glycolic acid. **International journal of cosmetic science**, v. 43, n. 4, p. 419–431, ago. 2021.

MACHADO, R. R. P.; DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N. R. B.; LESCHE, B.; DUARTE, R. S.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 891–899, 2015.

MACIEL TOMAZZOLI, M.; DO AMARAL, W.; RAUPP CIPRIANO, R.; CERIONI BELNIAKI, A.; CÁSSIA TOMASI, J. DE; MAIA, B. H. L. N. S.; DESCHAMPS, C. Chemical analyses and antioxidant activity of the essential oils from *baccharis dracunculifolia* DC. In Southern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, p. 1–11, 25 abr. 2024.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General aspects of nanoemulsions and their formulation. *Em: Nanoemulsions*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 3–20.

MD, A. Q.; BHUVANESHWARI; ROOPA. A systematic review on wound healing. **International Journal of Indigenous Herbs and Drugs**, p. 62–68, 12 nov. 2023.

MEHLING, A.; KLEBER, M.; HENSEN, H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 45, n. 5, p. 747–758, maio 2007.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHNIAK, B. B. Transfollicular drug delivery--is it a reality? **International journal of pharmaceutics**, v. 306, n. 1-2, p. 1–14, 8 dez. 2005.

MOFAZZAL JAHROMI, M. A.; SAHANDI ZANGABAD, P.; MOOSAVI BASRI, S. M.; SAHANDI ZANGABAD, K.; GHAMARYPOUR, A.; AREF, A. R.; KARIMI, M.; HAMBLIN, M. R. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 123, p. 33–64, 1 jan. 2018.

MOHAMAD SHAHRIPODDIN, N. S.; SALIM, N.; AHMAD, N. Influence of alkyl polyglucoside on physicochemical characteristics and in vitro studies of ibuprofen-loaded nanoemulsion formulations. **Colloid and polymer science**, v. 299, n. 10, p. 1631–1642, 8 out. 2021.

MOISE, A. R.; BOBIŞ, O. Baccharis dracunculifolia and Dalbergia ecastophyllum, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. **Plants**, v. 9, n. 11, 21 nov. 2020.

MONIKA, P.; CHANDRAPRABHA, M. N.; RANGARAJAN, A.; WAIKER, P. V.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N. Challenges in healing wound: Role of Complementary and alternative medicine. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 791899, 2021.

MONTEIRO, E. DA S. *et al.* Characterization and Determination of the Antibacterial Activity of Baccharis dracunculifolia Essential-Oil Nanoemulsions. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 12, 29 nov. 2023.

MONY, M. P.; HARMON, K. A.; HESS, R.; DORAFSHAR, A. H.; SHAFIKHANI, S. H. An updated review of hypertrophic scarring. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 5, 21 fev. 2023.

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, 16 dez. 1983.

MOTAHARI, H.; MOUSAVI, S. S.; HAGHIGHI, P. Raman, FTIR, and UV–Vis spectroscopic investigation of some oils and their hierarchical agglomerative clustering (HAC). **Food analytical methods**, v. 16, n. 7, p. 1237–1251, 27 maio 2023.

MOURO, C.; GOUVEIA, I. C. Electrospun wound dressings with antibacterial function: a critical review of plant extract and essential oil incorporation. **Critical reviews in biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 641–659, 18 jun. 2024.

MURAKAMI, S.; LI, W.; MATSUURA, M.; SATOU, T.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Composition and seasonal variation of essential oil in Alpinia zerumbet from Okinawa Island. **Journal of natural medicines**, v. 63, n. 2, p. 204–208, abr. 2009.

MUSA, S. H.; BASRI, M.; FARD MASOUMI, H. R.; SHAMSUDIN, N.; SALIM, N. Enhancement of physicochemical properties of nanocolloidal carrier loaded with cyclosporine for topical treatment of psoriasis: in vitro diffusion and in vivo hydrating action. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2427–2441, 28 mar. 2017.

NAGTODE, V. S. *et al.* Green surfactants (biosurfactants): A petroleum-free substitute for sustainability-comparison, applications, market, and future prospects. **ACS omega**, v. 8, n. 13, p. 11674–11699, 4 abr. 2023.

NASEEMA, A.; KOVOORU, L.; BEHERA, A. K.; KUMAR, K. P. P.; SRIVASTAVA, P. A

critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 287, p. 102318, jan. 2021.

NATARAJAN, V.; KRITHICA, N.; MADHAN, B.; SEHGAL, P. K. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 101, n. 4, p. 560–567, maio 2013.

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 397, p. 154–162, 1 maio 2013.

NETHI, S. K.; DAS, S.; PATRA, C. R.; MUKHERJEE, S. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. **Biomaterials science**, v. 7, n. 7, p. 2652–2674, 1 jul. 2019.

NICKEL, D.; FRSTER, T.; RYBINSKI, W. V. Physicochemical Properties of Alkyl Polyglycosides. *Em: Alkyl Polyglycosides*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p. 39–69.

NUNES, A.; MARQUES, P.; MARTO, J.; ASCENSO, A.; GONÇALVES, L.; FITAS, M.; PINTO, P.; SOTOMAYOR, J.; RIBEIRO, H. M. Sugar surfactant-based shampoos. **Journal of surfactants and detergents**, v. 23, n. 4, p. 809–819, 1 jul. 2020.

NUSSBAUM, S. R.; CARTER, M. J.; FIFE, C. E.; DAVANZO, J.; HAUGHT, R.; NUSGART, M.; CARTWRIGHT, D. An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. **Value in health: the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, v. 21, n. 1, p. 27–32, jan. 2018.

OLIVEIRA, J. M. D.; MEI, L. H. I. Surfactantes Reativos Não-iônicos em Polimerização em Emulsão de Látices de Acetato de Vinila - Vinil Neodecanoato: Influência nas Propriedades de Barreira de Água. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 22–30, 2009.

OLSSON, U.; WENNERSTRÖM, H. Globular and bicontinuous phases of nonionic surfactant films. **Advances in colloid and interface science**, v. 49, p. 113–146, 29 abr. 1994.

PAJIĆ, N. Z. B.; TODOSIJEVIĆ, M. N.; VULETA, G. M.; CEKIĆ, N. D.; DOBRIČIĆ, V. D.; VUČEN, S. R.; ČALIJA, B. R.; LUKIĆ, M. Ž.; ILIĆ, T. M.; SAVIĆ, S. D. Alkyl polyglucoside vs. ethoxylated surfactant-based microemulsions as vehicles for two poorly water-soluble drugs: physicochemical characterization and in vivo skin performance. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 67, n. 4, p. 415–439, 20 dez. 2017.

PALAZOLO, G. G.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in

comparison with soy protein isolates. **Food hydrocolloids**, v. 19, n. 3, p. 595–604, 1 maio 2005.

PANTELIC, I.; CUCKOVIC, B. 1 - Alkyl Polyglucosides: An emerging class of sugar surfactants. *Em*: PANTELIC, I. (Ed.). . **Alkyl Polyglucosides**. Oxford: Woodhead Publishing, 2014. p. 1–19.

PARISOTTO-PETERLE, J. *et al.* Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified β -caryophyllene. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 148, n. 105318, p. 105318, 30 maio 2020.

PAROUL, N.; LORASCHE, R.; ROSA, D.; SUELEN; PIAZZA, P.; BERTELLA, T.; SAORIN PUTON, B. M.; FALCÃO, L.; TONIAZZO BACKES, G.; ROGÉRIO; CANSIAN, L. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BACCHARIS TRIMERA PERS E BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA DC (ASTERACEAE). **Perspectivas**, v. 40, n. 151, p. 55–64, 2016.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAIS, D. R.; CAIXETA, S. C.; SOUSA, J. P. B. DE; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A. A. DA. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993–1001, abr. 2010.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; MACHADO, G.; SILVEIRA, E. [CITAÇÃO] Scientific evidences to pharmacological anticancer action of *Baccharis dracunculifolia* Brazilian propolis. **Revista de Pesquisa e Inovação**, 2009.

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 1, p. 135, 12 jan. 2020.

PENSALFINI, M.; TEPOLE, A. B. Mechano-biological and bio-mechanical pathways in cutaneous wound healing. **PLoS computational biology**, v. 19, n. 3, p. e1010902, mar. 2023.

PERCIVAL, N. J. Classification of wounds and their management. **Surgery**, v. 20, n. 5, p. 114–117, 1 maio 2002.

PEREIRA, C. A.; COSTA, A. C. B. P. D.; MACHADO, A. K. S.; JÚNIOR, M. B.; ZÖLLNER, M. S. A. C.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by *Candida* Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. **Mycopathologia**, v. 171, p. 103–109, 2011.

PÉREZ-RECALDE, M.; RUIZ ARIAS, I. E.; HERMIDA, É. B. Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**,

v. 38, p. 57–65, 1 jan. 2018.

PEZRON, I.; GALET, L.; CLAUSSE, D. Surface interaction between a protein monolayer and surfactants and its correlation with skin irritation by surfactants. **Journal of colloid and interface science**, v. 180, n. 1, p. 285–289, 1 jun. 1996.

PHILLIPS, C. J.; HUMPHREYS, I.; FLETCHER, J.; HARDING, K.; CHAMBERLAIN, G.; MACEY, S. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. **International wound journal**, v. 13, n. 6, p. 1193–1197, 1 dez. 2016.

PRAKASHAN, D.; ROBERTS, A.; GANDHI, S. Recent advancement of nanotherapeutics in accelerating chronic wound healing process for surgical wounds and diabetic ulcers. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 39, n. 2, p. 1059–1087, out. 2023.

PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. **The Journal of dermatology**, v. 45, n. 9, p. 1044–1052, set. 2018.

PUGLIA, C.; RIZZA, L.; DRECHSLER, M.; BONINA, F. Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid: characterization and in vitro and in vivo evaluation. **Drug delivery**, v. 17, n. 3, p. 123–129, abr. 2010.

QUEEN, D.; HARDING, K. What's the true costs of wounds faced by different healthcare systems around the world? **International wound journal**, v. 20, n. 10, p. 3935–3938, 14 dez. 2023.

_____. Estimating the cost of wounds both nationally and regionally within the top 10 highest spenders. **International wound journal**, v. 21, n. 2, p. e14709, 31 fev. 2024.

QUINTINO, R. L.; CROTTI, A. E. M.; REIS, A. C.; SQUARISI, I. S.; FERNANDES, C. C.; RIBEIRO, A. B.; MARTINS, C. H. G.; TAVARES, D. C.; COLLI, A. C.; MIRANDA, M. L. D. Brazilian Green Propolis: Chemical Composition of Essential Oil and Their In Vitro Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. 1–9, 2020.

RAJPUT, M.; KUMAR, N. Medicinal plants: A potential source of novel bioactive compounds showing antimicrobial efficacy against pathogens infecting hair and scalp. **Gene Reports**, v. 21, p. 100879, 1 dez. 2020.

RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANDO, B. Honey exposure stimulates wound repair of human dermal fibroblasts. **Burns & trauma**, v. 1, n. 1, p. 32–38, 18 jun. 2013.

RASTOGI, R. Fate of alkyl polyglucosides in the environment. **Journal of cosmetic science**, v. 72, n. 1, p. 91–98, jan. 2021.

RIPPKE, F.; SCHREINER, V.; SCHWANITZ, H.-J. The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. **American journal of clinical dermatology**, v. 3, n. 4, p. 261–272, 2002.

- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of cell communication and signaling**, v. 10, n. 2, p. 103–120, jun. 2016.
- ROBERTS, W. J.; SLOAN, K. B. Topical delivery of 5-fluorouracil (5-FU) by 3-alkylcarbonyloxymethyl-5-FU prodrugs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 5, p. 1028–1036, 1 maio 2003.
- RODRIGUES, M.; KOSARIC, N.; BONHAM, C. A.; GURTNER, G. C. Wound healing: A cellular perspective. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.
- RUSSO, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344–1364, ago. 2011.
- RYALL, C.; DUARAH, S.; CHEN, S.; YU, H.; WEN, J. Advancements in Skin Delivery of Natural Bioactive Products for Wound Management: A Brief Review of Two Decades. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1072, 17 maio 2022.
- RYBINSKI, W. VON; HILL, K. Alkyl Polyglycosides-Properties and Applications of a new Class of Surfactants. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 37, n. 10, p. 1328–1345, 5 jun. 1998.
- SANTOS, D. A. DOS; FUKUI, M. DE J.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N. P.; KHAN, S. I.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F.; SILVA FILHO, A. A. DA; QUINTÃO, N. L. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543–550, 3 fev. 2010.
- SANTRA, B.; SHNEIDER, M. N.; CAR, R. In situ Characterization of Nanoparticles Using Rayleigh Scattering. **Scientific reports**, v. 7, p. 40230, 10 jan. 2017.
- SAVIC, S.; PANTELIC, I.; LUKIC, M.; MARKOVIC, B.; MILIC, J. 2 - Behind the Alkyl Polyglucoside-based structures: Lamellar liquid crystalline and lamellar gel phases in different emulsion systems. *Em: PANTELIC, I. (Ed.). . Alkyl Polyglucosides*. Oxford: Woodhead Publishing, 2014. p. 21–52.
- SAVIĆ, S.; TAMBURIĆ, S.; SAVIĆ, M. M. From conventional towards new - natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 3, p. 353–369, 1 mar. 2010.
- SAXENA, N.; MANDAL, A. Natural Surfactants. *Em: SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*. SpringerBriefs in applied sciences and technology. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 19–24.
- SEYED AHMADI, S. G.; FARAHPOUR, M. R.; HAMISHEHKAR, H. Topical application of Cinnamon verum essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 35, n. 11, p. 686–694, 1 nov. 2019.
- SHAFIQ-UN-NABI, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.;

AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. Article 28, 6 abr. 2007.

SILVA, T. N. DA; REYNAUD, F.; PICCIANI, P. H. DE S.; HOLANDA E SILVA, K. G. DE; BARRADAS, T. N. Chitosan-based films containing nanoemulsions of methyl salicylate: Formulation development, physical-chemical and in vitro drug release characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 164, p. 2558–2568, 1 dez. 2020.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 252, p. 28–49, 28 abr. 2017.

SIQUEIRA, W. K.; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; MOURA, A. L.; PEREA, R.; ALVES, M. J. P.; FERNANDES, G. W.; AUBURN UNIVERSITY; UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. The role of Baccharis (Asteraceae) shrubs in the short-term restoration of Atlantic rainforest. **Nature Conservation Research**, v. 7, n. 2, 2022.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A.-T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, n. 4, p. 538–545, 1 abr. 2006.

SMYTHE, P.; WILKINSON, H. N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, 16 fev. 2023.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3-4, p. 102–110, 1 out. 2005.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological reports: PR**, v. 57 Suppl, p. 108–119, 2005.

STACHURSKI, J.; MICHALEK, M. The effect of the zeta potential on the stability of a non-polar oil-in-water emulsion. **Journal of colloid and interface science**, v. 184, n. 2, p. 433–436, 25 dez. 1996.

SUN, H.; MA, Y.; HUANG, X.; SONG, L.; GUO, H.; SUN, X.; LI, N.; QIAO, M. Stabilization of flaxseed oil nanoemulsions based on flaxseed gum: Effects of temperature, pH and NaCl on stability. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 176, n. 114512, p. 114512, 15 fev. 2023.

- SU, X.; LIU, X.; WANG, S.; LI, B.; PAN, T.; LIU, D.; WANG, F.; DIAO, Y.; LI, K. Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 43, n. 4, p. 830–838, 1 jun. 2017.
- SYCHROVÁ, A.; KOLÁRIKOVÁ, I.; ŽEMLIČKA, M.; ŠMEJKAL, K. Natural compounds with dual antimicrobial and anti-inflammatory effects. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 19, n. 6, p. 1471–1502, 24 dez. 2020.
- TADROS, T. F. **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2013.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108-109, p. 303–318, 20 maio 2004.
- TAKAMURA, A.; MINOWA, T.; NORO, S.; KUBO, T. Effects of Tween and Span Group Emulsifiers on the Stability of o/w Emulsions. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 2921–2926, 1979.
- TRUJILLO-CAYADO, L. A.; SANTOS, J.; CALERO, N.; ALFARO-RODRÍGUEZ, M.-C.; MUÑOZ, J. Strategies for reducing Ostwald ripening phenomenon in nanoemulsions based on thyme essential oil. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1671–1677, 15 mar. 2020.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **The Journal of international medical research**, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, set. 2009.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, fev. 2005.
- WALLACE, H. A.; BASEHORE, B. M.; ZITO, P. M. Wound healing phases. **Em: StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. .
- WANG, Z.; QI, F.; LUO, H.; XU, G.; WANG, D. Inflammatory microenvironment of skin wounds. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 789274, 1 mar. 2022.
- WHITTAM, A. J.; MAAN, Z. N.; DUSCHER, D.; WONG, V. W.; BARRERA, J. A.; JANUSZYK, M.; GURTNER, G. C. Challenges and opportunities in drug delivery for wound healing. **Advances in wound care**, v. 5, n. 2, p. 79–88, 1 fev. 2016.
- WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 55–57, jan. 2019.
- XUE, M.; ZHAO, R.; LIN, H.; JACKSON, C. Delivery systems of current biologicals for the treatment of chronic cutaneous wounds and severe burns. **Advanced drug delivery reviews**, v. 129, p. 219–241, 1 abr. 2018.

YAZARLU, O.; IRANSHAHI, M.; KASHANI, H. R. K.; RESHADAT, S.; HABTEMARIAM, S.; IRANSHAHI, M.; HASANPOUR, M. Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: A mechanistic review. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 174, n. 105841, p. 105841, dez. 2021.

YI, X.; WANG, C.; YU, X.; YUAN, Z. A novel bacterial biofilms eradication strategy based on the microneedles with antibacterial properties. **Procedia CIRP**, v. 89, p. 159–163, 1 jan. 2020.

ZENG, G.; ZHONG, F.; LI, J.; LUO, S.; ZHANG, P. Resveratrol-mediated reduction of collagen by inhibiting proliferation and producing apoptosis in human hypertrophic scar fibroblasts. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2389–2396, 7 dez. 2013.

ZESCH, A. Adverse reactions of externally applied drugs and inert substances. **Dermatosen in Beruf und Umwelt. Occupation and environment**, v. 36, n. 4, p. 128–133, jul. 1988.

ZHOU, H.; LUO, D.; CHEN, D.; TAN, X.; BAI, X.; LIU, Z.; YANG, X.; LIU, W. Current Advances of Nanocarrier Technology-Based Active Cosmetic Ingredients for Beauty Applications. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 14, p. 867–887, 13 jul. 2021.