

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

Natália Prado da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) PARA O TRATAMENTO
TÓPICO DA ACNE VULGAR**

Juiz de Fora

2019

Natália Prado da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) PARA O TRATAMENTO
TÓPICO DA ACNE VULGAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientadora: Prof. Dra. Priscila de Faria Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora

2019

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

Silva, Natália Prado da.

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA ACNE VULGAR / Natália Prado da Silva. -- 2019.

96 f.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Coorientadora: Guilherme Diniz Tavares

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Acne vulgar. 2. *Melaleuca alternifolia*. 3. Quitosana. 4. Nanopartícula polimérica. I. Pinto, Priscila de Faria, orient. II. Tavares, Guilherme Diniz, coorient. III. Título.

"Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) para o tratamento tópico da acne vulgar"

Natália Prado da Silva

ORIENTADORA: Priscila de Faria Pinto
COORIENTADOR: Guilherme Diniz Tavares

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26/07/2019

Priscila Gava Mazzola
(Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP)

Rodrigo Luiz Fabri
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Priscila de Faria Pinto
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Guilherme Diniz Tavares
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

AGRADECIMENTO

À Deus, pela força e proteção durante o caminho.

Ao meu noivo Rafael, por estar sempre ao meu lado e não me deixar desanimar nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Eliane e César, pelo amparo e pela força dada ao longo da minha vida e durante todo projeto.

Aos familiares e amigos, que mesmo à distância, torcem pelo meu sucesso.

À minha orientadora Dra. Priscila de Faria Pinto, por todo suporte e palavras de carinho e força.

Ao meu co-orientador Dr. Guilherme Diniz Tavares, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela paciência e atenção.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano), onde desenvolvi todo o meu trabalho.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo e ajuda durante o projeto.

À todos os colaboradores deste trabalho, NIPPAN, Pronatbio, LIDIPO, NIQUA, EMBRAPA GADO DE LEITE (Juiz de Fora), Grupo de Química Analítica (GQAQ – UFJF), Laboratório de Bioensaios (UFJF), por todo apoio.

À UFJF, FAPEMIG, CNPq (Processo nº426601/2016-5) e CAPES pelo auxílio financeiro e estrutural para o desenvolvimento do projeto;

Por fim, agradeço à todos que, de alguma forma, se envolveram e apoiaram esse projeto, tão importante na minha formação profissional e acadêmica.

RESUMO

Este trabalho apresenta por objetivo desenvolver nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) revestidas por quitosana contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM) para aplicação tópica no tratamento da acne. Visto a necessidade da pesquisa por novas possibilidades terapêuticas devido aos inconvenientes relacionados a terapia atual da doença, estudos têm comprovado as potencialidades do OM na terapia anti-acneica. Neste intuito, buscamos otimizar seus efeitos com a nanoestruturação, incluindo incremento de eficácia, redução de toxicidade e degradação, perda por volatilidade, aumento da estabilidade e controle de liberação, visando, assim, o desenvolvimento de uma formulação com maior eficiência e segurança para o tratamento tópico da acne. A caracterização do OM foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e as formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto às características físico-químicas [diâmetro médio, índice de polidispersividade (IP), potencial Zeta (pZ), pH, eficiência de encapsulação e morfologia], viabilidade celular em linhagem celular de fibroblastos (NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT) e atividade antimicrobiana frente à *C. acnes*. O OM apresentou como componentes majoritários Terpinen-4-ol (37,11%), γ -Terpineno (16,32%), α -Terpineno (8,19%), ρ -Cimeno (6,56%) e α -Terpineol (6,07%). As nanocápsulas de PCL apresentaram características físico-químicas semelhantes às descritas na literatura, com diâmetro médio entre 200 e 300nm, pZ negativo e IP < 0,3. Após o revestimento com quitosana, foi observado o aumento no diâmetro médio, bem com uma inversão nos valores de potencial Zeta das nanopartículas, sugerindo a ocorrência do revestimento, o que foi corroborado pelas imagens de microscopia. Além disso, formulações monodispersas (IP < 0,3) foram obtidas. O pH das nanocápsulas apresentou valores ligeiramente ácidos (5-6), compatíveis com a aplicação tópica. A eficiência de encapsulação foi de aproximadamente 95% (considerando a concentração do marcador químico principal, Terpinen-4-ol). No ensaio com as linhagens celulares, foi observado que a nanoestruturação pode contribuir para uma maior tolerabilidade das células em relação ao OM. Finalmente, os resultados da avaliação da eficácia antimicrobiana indicam que as nanocápsulas revestidas por quitosana são capazes de incrementar a atividade do óleo encapsulado. Diante disso, consideramos que o nanocarreador desenvolvido possa ser promissor para o tratamento tópico da acne vulgar.

Palavras-chave: *Melaleuca alternifolia*, nanocápsulas poliméricas, quitosana, acne vulgar.

ABSTRACT

This paper aims to develop chitosan-coated poly (ϵ -caprolactone) (PCL) nanocapsules containing *Melaleuca alternifolia* essential oil (MO) for topical application in the treatment of acne. Given the need for research for new therapeutic possibilities due to the inconveniences related to current therapy of the disease, studies have proven the potentialities of OM in anti-acne therapy. To this end, we seek to optimize its effects with nanostructuring, including increased efficacy, reduced toxicity and degradation, loss by volatility, increased stability and release control, thus aiming at the development of a more efficient and safe formulation for topical acne treatment. Characterization of OM was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and the formulations developed were evaluated for physical-chemical characteristics (mean diameter, polydispersity index (PDI), Zeta potential (pZ), pH, encapsulation efficiency and morphology], cell viability in fibroblast cell line (NIH/3T3) and keratinocytes (HaCaT) and antimicrobial activity against *C. acnes*. The main components of the OM were Terpinen-4-ol (37.11%), γ -Terpinene (16.32%), α -Terpinene (8.19%), p-Cymene (6.56%) and α -Terpineol (6.07%). The PCL nanocapsules presented physical-chemical characteristics similar to those described in the literature, with mean diameter between 200 and 300nm, pZ negative and PDI <0.3. After the coating with chitosan, the increase in the mean diameter was observed, as well as an inversion in the Zeta potential values of the nanoparticles, suggesting the occurrence of the coating, which was corroborated by the microscopy images. In addition, monodispersed formulations (PDI <0.3) were obtained. The pH of the nanocapsules presented slightly acidic values (5-6), compatible with the topical application. The encapsulation efficiency was approximately 95% (considering the concentration of the major chemical label, Terpinen-4-ol). In the assay with cell lines, it was observed that nanostructures may contribute to a greater tolerability of cells in relation to OM. Finally, the results of the evaluation of antimicrobial efficacy indicate that the chitosan-coated nanocapsules are able to increase the activity of the encapsulated oil. Therefore, we consider that the developed nanocarrier may be promising for the topical treatment of acne vulgaris.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*, polymeric nanoparticles, chitosan, acne vulgaris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação clínica da acne vulgar.....	15
Equação 1	Cálculo da concentração de Terpinen-4-ol na amostra.....	45
Figura 2	Patogênese da acne vulgar.....	16
Equação 2	Eficiência de encapsulação (%).....	45
Figura 3	Algoritmo para o tratamento da acne.....	19
Figura 4	Aspecto das folhas, flores e ramos terminais da <i>Melaleuca alternifolia</i>	23
Figura 5	Relação biossíntese de monoterpenos presentes do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	26
Figura 6	Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	28
Figura 7	Ilustração esquemática de diferentes tipos de nanoestruturas.....	32
Figura 8	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	33
Figura 9	Polimerização de abertura de anel de ϵ -caprolactona para poli(ϵ -caprolactona).....	35
Figura 10	Estrutura molecular da quitina (A) e quitosana (B).....	37
Figura 11	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	50
Figura 12	Distribuição de tamanho das nanocápsulas por intensidade (n = 3). (a) NC; (b) NC-OM; (c) NC-OM-QT.....	55
Figura 13	Distribuição do potencial Zeta das nanocápsulas (n = 3). a) NC; (b) NC-OM; (c) NC-OM-QT.....	58
Figura 14	Perfil cromatográfico do ultrafiltrado referentes às NC-OM (a), NC-OM após dopagem com padrão de Terpinen-4-ol (b), NC-OM-QT (c) e NC-OM-QT após dopagem com padrão de Terpinen-4-ol (b).....	61

Figura 15	Imagens de MFA das NC-OM (a) e das NC-OM-QT (b) vistas do topo (escala: 10x10 μm). Imagens de MFA em 3D das NC-OM (c) e das NC-OM-QT (d) (escala: 6x6 μm).....	63
	Esquema representativo dos possíveis fenômenos que contribuem para	
Figura 16	o achatamento das partículas durante a obtenção de imagens por MFA.	64
Figura 17	Gráfico de distribuição de tamanho das nanocápsulas por número fornecida pelo Zetasizer. NC-OM (a) e NC-OM-QT (b).....	65
Figura 18	Avaliação do OM, NC, NC-OM, NC-OM-QT sobre a viabilidade celular de linhagem celular de Fibroblasto NIH/3T3 após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento.....	67
Figura 19	Avaliação do OM, NC, NC-OM, NC-OM-QT sobre a viabilidade celular de linhagem celular de Queratinócitos HaCaT após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> , conforme padrão internacional.....	27
Tabela 2	Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas.....	42
Tabela 3	Constituintes do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> descritos na ISO 4730/2017.....	51
Tabela 4	Valores de diâmetro médio, IP, potencial zeta e pH das nanocápsulas.....	53
Tabela 5	Valores referentes á concentração do Terpinen-4-ol no resíduo de rotaevaporação	60
Tabela 6	Concentração inibitória mínima (CIM) e efeito das amostras frente à <i>C. acnes</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Peptídeos antimicrobianos
AP	Proteína ativadora
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNI	Confederação Nacional da Indústria
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de Luz Dinâmico)
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	Farnesil difosfato
GMCSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e de macrófagos
GPP	Geranil difosfato
IL	Interleucina
INT	Cloreto de Iodonitrotetrazólio
IP	Índice de polidispersividade
IPP	Isopentenil difosfato
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LDNano	Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas nanoestruturados
LPS	Lipopolissacarídeo
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MEV	Via acetato-mevalonato

MEP	Via metileritritol fostato
MFA	Microscopia de Força Atômica, do inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i> (AFM)
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NC	Nanocápsulas brancas
NC-OM	Nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>
NC-OM-QT	Nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> revestidas com quitosana
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NP	Nanopartículas poliméricas
OM	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> / Óleo de Melaleuca
PAR	Receptores ativados por proteases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
SBF	Soro Bovino Fetal
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTO	<i>Tea Tree Oil</i>
UVB	Radiação ultravioleta do tipo B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ACNE VULGAR.....	14
2.1.1	Fisiopatologia da acne vulgar	15
2.1.2	Tratamento da acne vulgar	18
2.1.2.1	<i>Tratamento tópico</i>	20
2.2	GÊNERO <i>Melaleuca</i>	22
2.2.1	<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (Myrtaceae)	23
2.2.1.1	<i>Óleo essencial de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae)</i>	25
2.3	NANOTECNOLOGIA.....	31
2.3.1	Nanopartículas poliméricas	32
2.4	QUITOSANA.....	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL.....	41
4.2	MÉTODOS.....	41
4.2.1	Caracterização do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	41
4.2.2	Desenvolvimento das nanocápsulas	42
4.2.2.1	<i>Preparação das nanocápsulas de poli (ϵ-caprolactona) contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i></i>	42
4.2.2.2	<i>Revestimento das nanocápsulas de poli (ϵ-caprolactona) contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> com quitosana</i>	43
4.2.3	Caracterização físico-química e morfológica das nanocápsulas	43
4.2.3.1	<i>Determinação do Diâmetro médio, Índice de Polidispersidade (IP) e Potencial Zeta</i>	43
4.2.3.2	<i>Determinação do pH</i>	44
4.2.3.3	<i>Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)</i>	44
4.2.3.3.1	Quantificação do Terpinen-4-ol no resíduo da rotavaporação.....	44
4.2.3.3.2	Quantificação do Terpinen-4-ol nas nanocápsulas.....	45
4.2.3.4	<i>Avaliação morfológica</i>	46

4.2.4	Caracterização biológica <i>in vitro</i> das nanocápsulas.....	46
4.2.4.1	<i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	46
4.2.4.1.1	Cultura de células.....	46
4.2.4.1.2	Ensaio de viabilidade celular.....	47
4.2.4.2	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana.....</i>	48
4.2.4.2.1	Estirpe microbiana.....	48
4.2.4.2.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	48
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i>	50
5.2	DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS.....	52
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS NANOCÁPSULAS.....	53
5.3.1	Determinação do Diâmetro médio, Índice de Polidispersidade (IP), Potencial Zeta e pH.....	53
5.3.2	Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE).....	59
5.3.2.1	<i>Quantificação do Terpinen-4-ol no resíduo da rotavaporação.....</i>	60
5.3.2.2	<i>Quantificação do Terpinen-4-ol nas nanocápsulas.....</i>	60
5.3.3	Avaliação morfológica.....	62
5.4	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	66
5.4.1	Avaliação da viabilidade celular.....	66
5.4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	72
6	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO I - Laudo Técnico do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel...	96

1 INTRODUÇÃO

A acne vulgar é uma patologia cutânea que afeta a unidade pilossebácea, acometendo a face, parte superior do tórax e dorso, principalmente. Ocorre, geralmente, no início da puberdade, afetando ambos os sexos, com picos entre 14-17 anos nas mulheres e 16-19 anos nos homens.

A doença é caracterizada pela formação de comedões (abertos e/ou fechados), pápulas, pústulas, nódulos e cistos. Sendo classificada em inflamatória ou não inflamatória, conforme as lesões. A patogênese é multifatorial, envolvendo a interação de fatores como hiperproliferação epidérmica folicular com hiperqueratose, excesso de produção de sebo, presença e atividade da bactéria comensal *Cutibacterium acnes*, estados de excesso de andrógenos e inflamação

Os tratamentos farmacológicos podem ser tópicos e/ou sistêmicos, de acordo com a gravidade da doença, sendo recomendada a terapia tópica para as formas de acne leve a moderada e associação de terapias (tópica e sistêmica) para formas mais severas. Dentre os inconvenientes relacionados à administração tópica dos medicamentos, destacam-se a ocorrência de eritema, irritação cutânea e fotossensibilidade provocados pelos retinóides e a resistência bacteriana aos antimicrobianos sintéticos. Tais problemas podem implicar em menor eficácia e/ou fracasso terapêutico, além da possibilidade de recidivas.

Dessa forma, torna-se importante a pesquisa por novas possibilidades terapêuticas para o tratamento tópico da acne vulgar, dentre as quais incluem a utilização de produtos naturais como fonte de substâncias bioativas. Sob essa perspectiva, estudos têm comprovado as potencialidades do uso dermatológico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OM) na terapia anti-acneica. Nesses estudos, observou-se eficácia semelhante ou superior do OM quando em comparação a ativos amplamente utilizados na terapêutica. Além disso, a associação desse óleo com ativos sintéticos também resultou em aumento da atividade anti-acneica. Ademais, existem relatos de menos efeitos adversos no uso do OM se comparado à fármacos sintéticos.

A veiculação de ativos através de sistemas nanoestruturados é uma alternativa viável para incrementar parâmetros de estabilidade, segurança e eficácia. As nanopartículas poliméricas são sistemas promissores para o carreamento de fármacos e, podem ser divididas em dois tipos principais: nanocápsulas e nanoesferas, as quais se diferenciam em relação à composição e estrutura. Diversos estudos têm se dedicado à preparação de nanocápsulas com superfície modificada com a finalidade de melhorar suas propriedades físico-químicas e

biológicas. Nesse sentido, partículas revestidas com o copolímero quitosana mostram-se promissoras devido as suas características de base fraca que favorece a interação com superfícies carregadas negativamente, como as membranas celulares, possui atividade antibacteriana e biocompatibilidade e biodegradabilidade.

O presente trabalho apresenta como objetivo desenvolver um produto inovador para o tratamento tópico da acne vulgar, por meio da estratégia de nanoestruturação do óleo essencial de *M. alternifolia*, o qual apresenta propriedades promissoras frente a essa patologia. Tendo em vista, o incremento de eficácia anti-acneica, redução de toxicidade e degradação extrínseca, perda por volatilidade, aumento da estabilidade e controle de liberação. Além da adição do revestimento com quitosana para aumento da eficiência anti-acneica e controle de liberação do OM. Pretendendo, assim, o desenvolvimento de uma formulação com maior eficácia e segurança para o tratamento tópico da acne.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ACNE VULGAR

A acne vulgar é uma dermatose inflamatória que afeta a unidade pilossebácea (OLIVEIRA, 2011), acometendo as áreas da pele com maior densidade de folículos sebáceos, as quais incluem a face, a parte superior do tórax e o dorso (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

É uma doença de pele comum que geralmente tem início na puberdade, atingindo ambos os sexos, com picos entre 14-17 anos nas mulheres e entre 16-19 anos nos homens (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; VAZ, 2003; VINHAL *et al.*, 2014). O *Global Burden of Disease Project* estima a prevalência da acne em 9,4%, classificando-a como a oitava doença mais prevalente no mundo (TAN; BHATE, 2015). Segundo dados norte-americanos a acne afeta 80-85% dos indivíduos com idades compreendidas entre os 12 e os 25 anos, caindo este número para 8% nos indivíduos entre os 25 e os 34 anos e para 3% entre os 35 e os 44 anos. Salienta-se que 12% das mulheres e 3% dos homens continuam com a afecção até aos 45 anos (BHATE; WILLIAMS, 2013; FIGUEIREDO *et al.*, 2011; VINHAL *et al.*, 2014).

No Brasil, a acne é mais frequente dos 14 aos 17 anos, com incidência de 1% na população masculina com início mais tardio (16-19 anos) e 5% na feminina, sendo geralmente mais grave nos homens e mais persistente nas mulheres (VAZ, 2003; VINHAL *et al.*, 2014). De acordo com o Censo Dermatológico da Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), realizado em 2006 com cerca de 55 mil pacientes do setor público e de clínicas privadas, a acne foi a causa mais frequente de atendimento acometendo 14 % dos pacientes atendidos pelos dermatologistas, sendo a faixa etária entre 15-25 anos a que concentra o maior número de pacientes (CAMPOS; PENNA, 2007).

Considerada uma patologia cutânea universal, a acne é caracterizada pela formação de comedões (abertos ou fechados), pápulas, pústulas e, menos frequentemente, de nódulos e cistos (TOIGO, 2015). As lesões da acne, do ponto de vista clínico, classificam-se em não-inflamatória (Grau I, leve) e inflamatória (Grau II-IV, moderada a grave), de acordo com o tipo de lesão predominante (OLIVEIRA, 2011; VAZ, 2003). A acne fulminante (Grau V) é uma manifestação grave, muito rara, que pode ocorrer durante a evolução da acne vulgar (Figura 1). Esse tipo de manifestação acomete principalmente adolescentes do sexo masculino, entre 13 a 16 anos, com acne leve a moderada. Sua etiologia ainda não é completamente elucidada. Estima-se que ocorre em menos de 1% da totalidade dos casos de acne (PEREIRA *et al.*, 2011; ZANELATO *et al.*, 2011).

Figura 1 – Classificação clínica da acne vulgar



Fonte: EADY; GLOOR; LEYDEN, 2003; SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014; OLIVEIRA, 2011; ZANELATO *et al.*, 2011

Em um estudo realizado em São Paulo com 452 adolescentes entre 10 e 17 anos, observou-se prevalência de 61,1% de acne comedogênica, 30,6% de acne papulopustulosa leve e 7,6% de moderada, afetando principalmente a face (97,5%). Além disso, os autores notaram que houve maior chance de evolução para a acne inflamatória com o aumento da idade (BAGATIN *et al.*, 2013).

A acne é, frequentemente, uma manifestação temporária da puberdade, mas com potencialidade de se manter e agravar. Por ser considerado um processo normal do desenvolvimento, há um atraso na procura de ajuda médica, o que pode levar ao aparecimento de cicatrizes que, além da estética da pele, podem atingir o aspecto psicossocial do paciente com diminuição da autoestima e da autoconfiança, conduzindo ao afastamento social e mesmo a depressão (BRENNER *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2011; VAZ, 2003).

2.1.1 Fisiopatologia da acne vulgar

A acne tem uma patogênese multifatorial, desenvolvendo-se devido a interação dos seguintes fatores: hiperproliferação epidérmica folicular com hiperqueratose, excesso de produção de sebo, presença e atividade da bactéria comensal *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)

anteriormente denominada como *Propionibacterium acnes* (DRÉNO *et al.*, 2018; ERDEI *et al.*, 2018; GHARAMTI; KANAFANI, 2017; PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018) devido a diferenças filogenéticas substanciais na sequência do gene 16S RNAr (SCHOLZ; KILLIAN, 2016), em estados de excesso de andrógenos e inflamação (Figura 2) (DEMINA *et al.*, 2017).

Figura 2 – Patogênese da acne vulgar



Fonte: FITZPATRICK'S DERMATOLOGY IN GENERAL MEDICINA, 2012.

A puberdade tem sido associada ao início da acne vulgar devido ao aumento dos andrógenos durante esse período, os quais estimulam a produção de sebo através da ligação de receptores sobre glândulas sebáceas e ductos pilossebáceos. Embora produzido em maiores quantidades pelas glândulas supra-renais e as gônadas, os andrógenos também são sintetizados localmente dentro das glândulas sebáceas, onde promovem proliferação de queratinócitos, bem como das próprias glândulas (DAS; REYNOLD, 2014). Este estímulo sobre as glândulas sebáceas e os queratinócitos foliculares aumentam a produção sebácea e levam a hiperqueratose folicular que, juntamente com a descamação anormal dos corneócitos, resultam na formação do microcomedão, lesão inicial da acne e ainda não perceptível visualmente, devido a oclusão do ducto folicular (MONTAGNER; COSTA, 2010). Os hormônios andrógenos promovem a comedogênese, também, pela regulação dos fatores de crescimento e da IL-1 α (DAS; REYNOLD, 2014). De modo geral, a produção sebácea depende dos androgênios circulantes e da resposta da unidade pilossebácea (MONTAGNER; COSTA, 2010).

Por outro lado, a alteração na barreira epidérmica facilita a penetração de microrganismos e ocasiona o acúmulo de sebo no interior do folículo, levando a dilatação do mesmo, originando o comedão (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008; MONTAGNER; COSTA, 2010). Esses microrganismos hidrolisam os triglicerídeos do sebo através de esterases, resultando na liberação de ácidos graxos livres que irritam a parede folicular, induzem à queratinização e ativam a resposta imunológica com liberação de mediadores pró-inflamatórios que, por sua vez, atraem leucócitos polimorfonucleares para local, os quais ampliam a liberação de citocinas, desencadeando o processo inflamatório local, gerando as pápulas e pústulas (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008; MONTAGNER; COSTA, 2010). A interação entre a bactéria e a resposta imunológica acarretam a liberação de proteases hidrolíticas que atuam na parede epitelial infundibular, fragilizando-a e levando ao extravasamento de substâncias irritantes para a derme subjacente, essa ruptura forma os nódulos (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008; DEMINA *et al.*, 2017; MONTAGNER; COSTA, 2010). No processo de cura, essas lesões mais profundas formam as cicatrizes.

Dentre as bactérias residentes na pele, a principal causadora da acne é a *Cutibacterium acnes* (CALABRESE, 2012). Componente do microbioma das unidades pilossebáceas e estrato córneo, a *C. acnes* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, não formador de esporos, pleomórfico e aerotolerante (AUBIN *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2015; PERRY; LAMBERT, 2006). A bactéria foi, a princípio, considerada um agente de baixo potencial patogênico, entretanto o conhecimento sobre a sua diversidade genética e potenciais fatores de virulência, como resistência à fagocitose, fizeram com que, atualmente, tal microrganismo seja considerado um patógeno potencialmente oportunista (AUBIN *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2015). Durante algum tempo, a *C. acnes* foi considerada suscetível a uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo clindamicina, β -lactâmicos e quinolonas. No entanto, na última década, a taxa de bactérias resistentes a antimicrobianos aumentou, especialmente para macrólidos e tetraciclina, mas também em relação à rifampicina (FEUILLOLAY *et al.*, 2016). Um indivíduo pode carrear complexa população de *C. acnes*, com número de clones variável de um a seis, que apresentam distintos potenciais patogênicos e diferentes padrões de resistência, aspectos que impactam diretamente a dificuldade do tratamento da acne (NEVES *et al.*, 2015). Neste contexto, ressalta-se a importância da busca por novas alternativas terapêuticas para o controle e tratamento da acne.

A *C. acnes* mostra interações complexas com eventos-chave implicados na patogênese da acne. A bactéria pode interagir com o sistema imunológico inato, incluindo receptores

Toll-like (TLRs, do inglês, *toll like receptor*), peptídeos antimicrobianos (AMPs), receptores ativados por proteases (PAR) e metaloproteinase de matriz (MMP) e regula a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), por queratinócitos humanos, sebócitos e macrófagos (PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018).

Os TLRs são receptores de reconhecimento padrão expressos na superfície de células dendríticas, queratinócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e células *natural killer*. São proteínas transmembranas capazes de mediar resposta às moléculas padrão associadas aos patógenos. Quando os TLR são ativados por ligantes microbianos, desencadeia-se resposta intracelular que convergem na translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, o qual modula, então, a expressão de vários genes de resposta imune (DAS; REYNOLD, 2014; DEMINA *et al.*, 2017). Citocinas mediadas por TLR também podem induzir metaloproteinases de matriz (MMPs), endopeptidases produzidas por diferentes tipos celulares, incluindo os queratinócitos, que desempenham papéis na inflamação da acne, destruição da matriz dérmica e na formação de cicatrizes (DAS; REYNOLD, 2014; MONTAGNER; COSTA, 2010). Existem 11 tipos de TLR e descobriu-se que a *C. acnes* possui um fator solúvel que, na presença de linfócito CD14, é capaz de ativar, principalmente, os TLR-2 e TLR-4 e induzir à síntese de fatores pró-inflamatórios locais, como o TNF- α , IL-1 β , prostaglandinas, leucotrienos e IL-8 (MONTAGNER; COSTA, 2010). Especificamente, a estimulação de TLR2 pela *C. acnes* aumenta as concentrações de IL-8 e IL-12 (DEMINA *et al.*, 2017).

Estudos recentes, realizados *in vitro*, revelaram que a *C. acnes* pode induzir a produção de IL-17 pelas células T (Th1/Th17). Adicionalmente, as espécies oxigênio-reativas, em especial o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, geradas por fagócitos, como os neutrófilos, tem importante papel de mediação inflamatória da acne (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008). Por outro lado, porfirinas secretadas pelo microrganismo podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que induzem a inflamação nos queratinócitos e resultam em lesões acneicas (PLATSIDAKI; DESSINIOTI, 2018).

2.1.2 Tratamento da acne vulgar

O tratamento farmacológico da acne visa controlar os diferentes fatores que constituem a patogenia. A escolha mais adequada de tratamento envolve a integração de

múltiplos aspectos como o tipo de lesão, a distribuição das lesões, duração da doença, resposta passada e presente à terapia, tendência à cicatrização e pigmentação da pele (OLIVEIRA, 2011; VITHAL *et al.*, 2014).

Uma ampla gama de tratamentos tópicos e sistêmicos está disponível, sendo recomendada a terapia tópica para as formas de acne leve a moderada, enquanto que para as formas mais severas uma combinação de terapia tópica e sistêmica pode ser necessária (Figura 3). Os agentes utilizados no tratamento tópico da acne são os retinóides (tretinoína, adapaleno, tazaroteno), o ácido azelaico, o peróxido de benzoíla e antimicrobianos (sobretudo clindamicina e eritromicina). Por outro lado, outras terapias tópicas têm sido aplicadas (*peeling* químico, *peeling* mecânico, fototerapia, agentes queratolíticos e antiandrogênicos). O tratamento sistêmico deve ser considerado nas formas inflamatórias da acne e de difícil controle. Podem ser usados antimicrobianos orais (particularmente tetraciclina e eritromicina), antiandrógenos (acetato de ciproterona, espironolactona, bem como contraceptivos orais) e retinóides sistêmicos (isotretinoína) (OLIVEIRA, 2011; VITHAL *et al.*, 2014).

Figura 3 - Algoritmo para o tratamento da acne

		LEVE		MODERADA		GRAVE	
		Na gravidez	Comedônica	Misto e papulo-pustulosa	Misto e papulo-pustulosa	Nodular (nódulos < 5 mm)	Nodular/Conglobata
1ª Escolha		Adiar até pós-amamentação ¹⁹	Retinóide tópico	Retinóide tópico + Antimicrobiano tópico	Antibiótico oral + Retinóide tópico +/- PB	Antibiótico oral + retinóide tópico + PB	Isotretinoína oral
Alternativas		Parece não haver risco com PB, eritromicina tópica e ácido azelaico; Acne grave: eritromicina oral isolada/ com suplementos de sais de zinco ¹⁹	Outro retinóide tópico ou Ácido azelaico ou Ácido salicílico	Outro antimicrobiano tópico + Outro retinóide tópico ou Ácido azelaico	Outro antibiótico oral + Outro retinóide tópico +/- PB	Isotretinoína oral ou Outro antibiótico oral + Outro retinóide tópico +/- PB	Alta dose de antibiótico oral + Retinóide tópico + PB
Alternativas para mulheres		-	Igual a 1ª escolha	Igual a 1ª escolha	Terapêutica hormonal + Retinóide tópico/Ácido azelaico +/- Antimicrobiano tópico	Terapêutica hormonal + Retinóide tópico +/- Antibiótico tópico ou oral	Alta dose de terapêutica hormonal + Retinóide tópico +/- Outro antimicrobiano tópico ou oral
Terapia de manutenção		-	Retinóide tópico		Retinóide tópico +/- PB		

Fonte: ADAPTADO DE SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014

2.1.2.1 Tratamento tópico

Retinóides

Os retinóides são derivados da vitamina A (retinol) e possuem a capacidade de se ligar e ativar receptores do ácido retinóico (AR) diretamente ou por conversão metabólica e, assim, induzir a transcrição do gene que codifica o AR (OLIVEIRA, 2011).

Essa classe de fármacos de uso tópico (isolados ou em associação) é tida como a primeira linha de tratamento da acne leve a moderada. São os agentes comedolíticos mais eficazes para o tratamento da acne vulgar, pois influenciam na proliferação e diferenciação celular e normalizam a descamação anormal do epitélio folicular, evitando a formação de novas lesões, além de diminuir a formação e o número de microcomedões (OLIVEIRA, 2011; MONTAGNER; COSTA, 2010).

Estes agentes também afetam/modulam múltiplas vias inflamatórias: inibem a migração de leucócitos, incluindo a quimiotaxia dos neutrófilos, a expressão do receptor de pedágio, produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos, produção de citocinas e o metabolismo do ácido araquidônico. Além disso, os retinóides regulam o fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1) que, por sua vez, resulta na inibição de MMPs, enzimas responsáveis pela formação de cicatrizes na acne (DRENO *et al.*, 2015; GAMBLE *et al.*, 2012). Relata-se também que tanto a tretinoína como o adapaleno inibem a expressão de TLR2 em monócitos e evitam a liberação de radicais livres de oxigênio pelos neutrófilos (DAS; REYNOLDS, 2014).

A tretinoína é principal representante dessa classe de medicamentos. Foi o primeiro retinóide tópico estudado pertencente à primeira geração juntamente com a isotretinoína oral, é o fármaco tópico de escolha para o tratamento da acne não-inflamatória (comedão aberto ou fechado). Está disponível nas concentrações de 0,025%, 0,05% e 0,1% na forma de creme. O uso da tretinoína leva à diminuição da espessura do estrato córneo, aumentando a susceptibilidade da pele a danos causados pelo sol, vento, frio ou secura, e diminuindo a tolerância a adstringentes, solventes orgânicos e sabonetes. Além disso, seu uso é limitado por causar irritação local após o início da terapia, ocasionando baixa tolerabilidade e adesão do paciente. Ademais, possui alta instabilidade na presença de luz, ar e calor (OLIVEIRA, 2011; VAZ, 2003; VITHAL *et al.*, 2014).

Atualmente, a utilização de agentes terapêuticos com mecanismos complementares, associando retinóides tópicos com antimicrobianos que não contribuem para resistência

bacteriana, como o peróxido de benzoíla, tem sido apresentado como a primeira linha de tratamento da acne. O objetivo é abranger múltiplos fatores patogênicos, tratando, concomitantemente, lesões não inflamatórias e inflamatórias (GAMBLE *et al.*, 2012; VITHAL *et al.*, 2014).

Antimicrobianos tópicos

Ao longo dos anos, produtos tópicos de caráter bacteriostático ou bactericida foram introduzidos para o tratamento da acne vulgar. Nessa categoria, pode-se citar o peróxido de benzoíla, a eritromicina, a clindamicina e ácido azelaico (MONTAGNER; COSTA, 2010).

O peróxido de benzoíla é um fármaco com ação bactericida eficaz no tratamento da acne inflamatória, embora também possua alguma atividade comedolítica e anti-inflamatória. Foi introduzido no tratamento da acne em 1934 e é amplamente utilizado na terapia tópica. Esse fármaco libera radicais livres de oxigênio que oxidam as proteínas bacterianas, ocasionando a morte do microrganismo. A redução da população bacteriana leva à diminuição da produção de ácidos graxos livres (comedogênicos e irritantes) e de fatores quimiotáticos. Além disso, também parece reduzir o tamanho das glândulas sebáceas. Relata-se que o peróxido de benzoíla não induz resistência bacteriana, entretanto as diretrizes de tratamento geralmente não recomendam seu uso isoladamente, mas em combinação com um retinóide tópico. As formulações tópicas estão disponíveis nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 20%, comumente sob as formas de sabonetes, géis e cremes. O efeito é dose dependente, assim como a ocorrência de irritações (DAS; REYNOLDS, 2014; DRENO *et al.*, 2015; MONTAGNER; COSTA, 2010; VAZ, 2003).

Como descrito anteriormente, os antimicrobianos tópicos utilizados com maior frequência são clindamicina e eritromicina, ambos com eficácia semelhante, sendo indicados no tratamento da acne não-inflamatória e inflamatória leve. Esses fármacos inibem o crescimento e atividade da *C. acnes*, devido à ligação com a subunidade 50S do ribossomo, o que leva a inibição da síntese proteica (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Tais ativos podem ser administrados isoladamente ou em combinação com outros fármacos tópicos, como a tretinoína ou o PB e estão disponíveis sob diferentes formas farmacêuticas, tais como soluções, loções, géis e cremes (DAS; REYNOLDS, 2014; MONTAGNER; COSTA, 2010; VAZ, 2003). É importante ressaltar que estudos têm demonstrado o aumento de casos de resistência da *C. acnes* aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da acne (AUBIN *et al.*, 2014; TOYNE *et al.*, 2012; WALSH; EFTHIMIOU; DRÉNO, 2016).

Nesse sentido, os protocolos clínicos preconizam a utilização de antimicrobianos associados em detrimento à monoterapia (COSTA; BAGATIN, 2013; SILVA *et al.*, 2014; THIBOUTOUT *et al.*, 2009).

Pelo exposto, no que diz respeito aos inconvenientes relacionados à administração tópica dos ativos apresentados, observa-se a ocorrência de eritema, irritação cutânea e fotossensibilidade provocados pelos retinóides (TRIPATHI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015) e, sobretudo, uma importante questão de saúde pública: a resistência bacteriana oriunda da utilização indiscriminada dos antimicrobianos sintéticos (PATEL *et al.*, 2010; ANDRIESSEN; LYNDE, 2014; DEL ROSSO, 2015; LIU *et al.*, 2015). Tal problema é agravado pela exposição prolongada dessas substâncias em doses abaixo da concentração inibitória mínima e implica em menor eficácia e/ou insucesso terapêutico, além da possibilidade de recidivas (NGUYEN; EICHENFIELD, 2015).

A *C. acnes* resistente tem sido associada a infecções mais graves, como artrite séptica e endocardite, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos (DELAHAYE *et al.*, 2005; BERTHELOT *et al.*, 2006). Nesse contexto, visando contornar os problemas relatados, torna-se importante a pesquisa por novas possibilidades terapêuticas para o tratamento tópico da acne vulgar. Dentre essas, a utilização de produtos naturais merece destaque (UPADHYAY *et al.*, 2014; KARYGIANNI *et al.*, 2016). Sob essa perspectiva, estudos têm comprovado as potencialidades do uso dermatológico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na terapia anti-acneica (HAMMER *et al.*, 2003; MALHI *et al.*, 2017; PAZYAR *et al.*, 2013; HAMMER, 2015).

2.2 GÊNERO *Melaleuca*

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família Myrtaceae, da Ordem Myrtales, inclui cerca de 230 espécies com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Austrália e na América do Sul. Tradicionalmente, o seu uso deve-se as propriedades medicinais e aromáticas (MONTEIRO *et al.*, 2013; SILVA, 2007).

Quanto à morfologia, são descritas como espécies arbóreas com folhas simples; alternas ou opostas decussadas, sésseis ou pecioladas; estípulas ausentes; lâmina inteira, coriácea, lanceolada, base simétrica, margem lisa; nervação penínérvea; nervuras secundárias fechadas; proeminentes ou não, visíveis; nervuras de ordem superior reticuladas. Inflorescências em racemos espiciformes ou representadas por flores solitárias; terminais ou axilares; em eixos sem ramificações. Flores monoclinas (bissexuais) ou diclinas (femininas

estéreis); epíginas; hipanto fundido ao ovário na região proximal, subgloboso ou campanulado; perianto presente. Cálice com 5 sépalas; livres ou parcialmente fundidas; persistentes no fruto ou caducas. Corola com 5 pétalas; livres; inteiras. Estames numerosos, branco esverdeados, livres ou conados; filetes curtos ou longos, fundidos na base; livres do perianto; polistêmones; organizados em 5 fascículos opostos às pétalas; anteras dítecas, dorsifixas (raro basifixas), rimosas. Fruto cápsula, com hipanto normalmente lenhoso ou sublenhoso, semiglobosa a globosa, com deiscência apical, com muitas sementes. Sementes obovoides-oblongas à obovoides, não aladas; testa delgada; endosperma ausente (MONTEIRO *et al.*, 2013).

Embora o gênero *Melaleuca* seja constituído por um grande número de espécies, três são mais utilizadas comercialmente: *Melaleuca alternifolia* Cheel, *Melaleuca cajuputi* (J.F. Gmel.) Powell e *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (MONTEIRO *et al.*, 2013).

2.2.1 *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)

A espécie *Melaleuca alternifolia* (Figura 4), conhecida internacionalmente como “*tea tree*” (árvore de chá), é nativa da costa subtropical nordeste da Austrália, região de *New South Wales*, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios (OLIVEIRA, 2009; LEMOS, 2008).

As atividades biológicas associadas à espécie decorrem do óleo essencial, sendo este um dos mais estudados quanto a sua composição, propriedades medicinais e toxicidade (MONTEIRO *et al.*, 2013). A denominação óleo de *Melaleuca* (TTO - *tea tree oil*) é reconhecida e adotada oficialmente pelo *Australian Therapeutic Goods Administration* para o óleo essencial extraído da *M. alternifolia* (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Figura 4 - Aspecto das folhas, flores e ramos terminais da *Melaleuca alternifolia*.



Fonte: MARINI, 2014; OLIVEIRA, 2009; THOMSEN; HAMMER; RILEY, 2010

O termo *Tea Tree Oil* foi denominado no ano de 1777, por James Cook. Esse capitão observou que aborígenes nativos da região de *New South Wales* produziam um chá, a partir de uma árvore pequena de folhas verdes escuras, até então desconhecida. Além das suas atribuições aromáticas, os nativos da região alegavam que a planta possuía propriedade de cura e crenças sobre lagos (no qual a planta havia sido imersa) também eram muito frequentes (KULMANN, 2018). A natureza aromática das folhas de *Melaleuca alternifolia* provavelmente teria levado à sua utilização pelos aborígenes (CARSON; RILEY, 1993). Posteriormente, os membros da tripulação de James Cook descreveram no final do século XVIII o uso do óleo da árvore do chá para o mundo ocidental (SALLER *et al.*, 1998).

Além da *M. alternifolia*, várias espécies próximas, *M. cajuputi*, *M. leucadendron*, *M. linariifolia* e *M. quinquenervia* foram utilizadas pelos aborígenes para o tratamento de dores de cabeça, resfriados e como repelente de insetos. Na maioria dos casos, as folhas e pequenos galhos eram esmagados e o vapor inalado. Por vezes, as folhas maceradas foram embebidas em água e ingeridas ou derramadas sobre o corpo (CARSON; RILEY, 1993).

Com o passar dos anos, tais relatos despertaram a curiosidade de pesquisadores que passaram a buscar uma explicação científica para o efeito curativo da planta (KULMANN, 2018). O óleo essencial foi destilado pela primeira vez em 1925 (SALLER *et al.*, 1998) e, por décadas, a extração do mesmo foi realizada pelo corte manual das folhas e por meio do processo de destilação em alambiques. Em 1930 teve-se a primeira publicação em um Jornal de odontologia, no qual MacDonald, um pesquisador, relatava propriedades antissépticas da planta (KULMANN, 2018). Dessa forma, óleo da “árvore do chá” tornou-se um agente antisséptico padrão para cirurgia, especialmente para cirurgia dentária (SALLER *et al.*, 1998). Além disso, diversos relatos da época destacaram diversas condições que haviam respondido à aplicação de óleo da *tea tree*, tais como doenças ginecológicas, infecções bacterianas e fúngicas de natureza diversa (CARSON; RILEY, 1993).

Durante a 2ª Guerra Mundial, o óleo essencial foi usado em grandes quantidades como agente antisséptico local por soldados australianos, sendo incluído como item básico nas caixas de primeiros socorros (LEMOS, 2008; SALLER *et al.*, 1998). Nos anos do pós-guerra, a indústria do óleo de *Melaleuca* entrou em declínio devido a inúmeros fatores, em especial àqueles relacionados ao fornecimento não confiável, qualidade variável e sobretudo ao advento dos antibióticos. Neste ponto, o interesse australiano no óleo de *M. alternifolia* praticamente cessou (CARSON; RILEY, 1993).

No entanto, a partir do desenvolvimento da etnomedicina e com o aumento da resistência à antibióticos na década de 70, o óleo de *tea tree* foi "redescoberto". Com isso,

houve um aumento da pesquisa científica sobre sua eficácia, o que resultou em uma grande variedade de produtos à base do óleo de *Melaleuca* na Austrália e no exterior (SALLER *et al.*, 1998), incluindo óleos, géis, creme, loção para as mãos e para o corpo, xampus, condicionadores, bálsamos para os pés, sabonetes, linimentos, pastas de dente, repelentes de insetos, dentre outros (CARSON; RILEY, 1993).

No final da década de 80, foram publicados os primeiros estudos sobre a composição do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*. Tais estudos avaliaram aproximadamente 830 amostras do óleo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e, com isso, foi possível a detecção de 100 compostos (BROPHY *et al.*, 1989), incluindo hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos (KULMANN, 2018).

2.2.1.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*)

O óleo essencial de *M. alternifolia* é predominantemente formado por metabólitos terpenoídicos (KESZEI; HASSAN; FOLEY, 2010), classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural, formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômetro dimetilalil difosfato (DMAPP), sendo classificados de acordo com o número de isoprenos que os constituem (JAKIEMIU, 2008; SANTOS, 2015). O geranil difosfato, molécula formada pela ligação de duas unidades isoprênicas (IPP e DMAPP), origina o carbocátion linalil que, por deslocamento de carbocátion, forma outras moléculas (geranil carbocátion, α -terpinil carbocátion, terpenenil carbocátion, piperitenil carbocátion e felandril carbocátion), gerando inúmeros e distintos monoterpênicos encontrados no OM (Figura 5) (KESZEI; HASSAN; FOLEY, 2010).

máximos e/ou mínimos para 15 componentes majoritários do óleo (Tabela 1), selecionados devido inúmeros fatores, incluindo a verificação de proveniência e atividade biológica (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Na Figura 5 estão representadas as estruturas químicas dos principais componentes do óleo.

Tabela 1 – Composição do óleo de *Melaleuca alternifolia*, conforme padrão internacional.

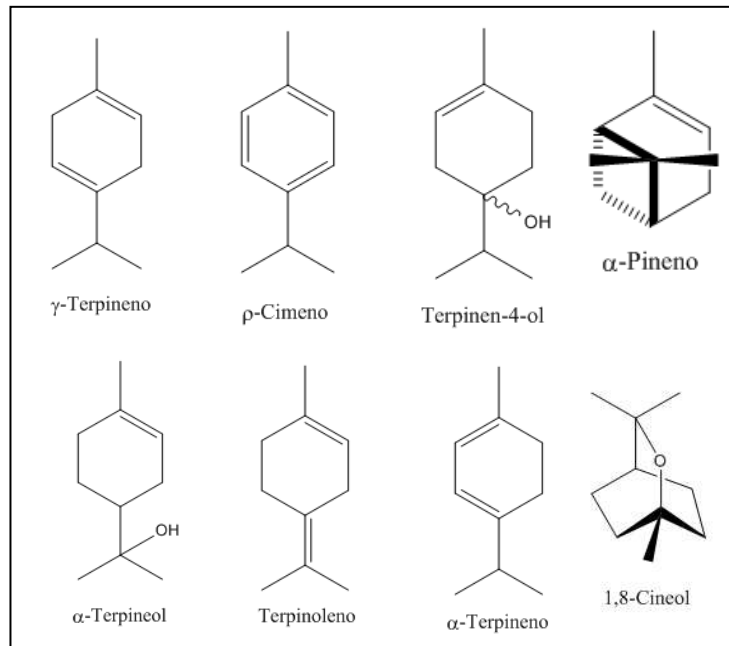
Componentes	Composição (%) - ISO 4730^a	Tipo do constituinte^b
Terpinen-4-ol	35,0 – 48,0	Monoterpeno oxigenado
γ -Terpineno	14,0 – 28,0	Monoterpeno
α -Terpineno	6,0 – 12,0	Monoterpeno
1,8-Cineol	Traços* – 10,0	Monoterpeno oxigenado
Terpinoleno	1,5 – 5,0	Monoterpeno
ρ -Cimeno	0,5 – 8,0	Monoterpeno
α -Pinoeno	1,0 – 4,0	Monoterpeno
α -Terpineol	2,0 – 5,0	Monoterpeno oxigenado
Aromadendreno	0,2 – 3,0	Sesquiterpeno
δ -Cadineno	0,2 – 3,0	Sesquiterpeno
Limoneno	0,5 – 1,5	Monoterpeno
Sabineno	Traços* – 3,5	Monoterpeno
Globulol	Traços* – 1,0	Sesquiterpeno oxigenado
Viridiflorene	0,1 – 3,0	Sesquiterpeno
Viridiflorol	Traços* – 1,0	Sesquiterpeno oxigenado

Legenda: ^aInternacional Organization for Standardization (ISO) standard n°4730. * Traços < 0,01%.

^bAdaptado de Carson; Hammer; Riley, 2006.

Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Figura 6 – Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *M. alternifolia*



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

O Comitê Australiano de Padronização estabeleceu que o óleo deve conter quantidades de 1,8-Cineol abaixo de 15% e de Terpinen-4-ol acima de 30% para que tenha eficácia mínima como anti-séptico (SIMÕES *et al.*, 2002). O 1,8-Cineol é considerado o principal causador de irritação cutânea, entretanto, tendo sido relatado também aumentar a permeabilidade da membrana a outros agentes antimicrobianos. O Terpinen-4-ol é referido como principal responsável pela ação biológica, sobretudo antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Devido ao seu amplo arsenal de propriedades medicinais, como atividade antibacteriana (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; GRAZIANO *et al.*, 2016; HAMMER *et al.*, 2003; NICOLIĆ *et al.*, 2017), antifúngica (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; FLORES, 2011; MARTINS *et al.*, 2010; TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013), anti-inflamatória (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), antiviral (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; GAROZZO *et al.*, 2009), antiparasitária (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; HADAŚ; DERDA; CHOLEWIŃSKI, 2017), inseticida (LIAO *et al.*, 2016) e anti-tumoral (NAKAYAMA *et al.*, 2017). O óleo essencial de *M. alternifolia* (OM) tem sido utilizado em formulações farmacêuticas e cosméticas como xampus, sabonetes, pastas dentais, antissépticos bucais, em produtos para a limpeza da pele oleosa e/ou acneica e removedores de maquiagem, em produtos pós-barba, pós-depilatórios, desodorantes, repelente de insetos, produtos veterinários, dentre outros (OLIVEIRA, 2009; GARCIA *et al.*, 2009). Sua faixa de

concentração usual varia de 0,5 - 5,0% em cosméticos, 5,0 - 10,0% nas preparações farmacêuticas, puro (100%) nas infecções mais resistentes e de 0,5- 1,0% como conservante (GARCIA *et al.*, 2009)

Estudos relataram a atividade antimicrobiana do óleo de Melaleuca (TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013; FLORES, 2011) para inúmeras cepas bacterianas, como *Acinetobacter baumannii*, *Aemonas sóbria*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia mascescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o óleo demonstrou susceptibilidade frente a cepas resistentes como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e resistentes à mupirocina (CARSON *et al.*, 1995; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Dados da literatura demonstram que a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo para a ação bactericida varia de 0,25-2%, dependendo do microrganismo envolvido (FLORES, 2011). Particularmente, na revisão realizada por Carson, Hammer e Riley (2006), o óleo de Melaleuca apresentou CIM variando entre 0,05-0,63% e a concentração bactericida mínima (CBM) de 0,5%.

Ainda em relação à atividade antimicrobiana, estudos realizados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sugerem que o mecanismo de ação antimicrobiano do óleo de Melaleuca consiste principalmente, na alteração da permeabilidade da membrana plasmática do microrganismo, interferência na bomba de efluxo dos íons potássio e na inibição do processo respiratório (CARSON; MEE; RILEY, 2002; COX *et al.*, 2000; GUSTAFSON *et al.*, 1998)

Quanto à atividade anti-inflamatória do óleo de Melaleuca, existem relatos de que o Terpinen-4-ol, α -Terpineol e 1,8-Cineol inibiram a produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-10 (IL-10) por monócitos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) em cerca de 50% e prostaglandina E₂ em 30% após 40 horas. Mas destes, apenas o Terpinen-4-ol conseguiu reduzir a produção de IL-8 (HART *et al.*, 2000). Observou-se também que Terpinen-4-ol e α -Terpineol são capazes de suprimir a produção de superóxido por monócitos estimulados. Adicionalmente, relata-se que o óleo essencial de *M. alternifolia* diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos e monócitos (BRAND *et al.*, 2001). Também, foi demonstrado que esse óleo, após aplicação tópica, é capaz de modular o edema associado à fase eferente de uma resposta de hipersensibilidade de contato em camundongos, mas não o desenvolvimento de edema na pele de camundongos não sensibilizados ou a resposta edematosa à exposição à UVB. Esta atividade foi atribuída principalmente ao Terpinen-4-ol e α -Terpineol. O trabalho mostrou que

o Terpinen-4-ol, mas não o 1,8-Cineol ou o α -Terpineol, modula a vasodilatação e o extravasamento plasmático associados à inflamação induzida por histamina em seres humanos (BRAND *et al.*, 2002; BRAND *et al.*, 2002).

Em relação à atividade anti-acneica, diversas publicações comprovaram a eficácia do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, bem como de seus constituintes isolados em estudos *in vitro* (BIJU *et al.*, 2005; KOH *et al.*, 2002; NAND; DRABU; GUPTA, 2011; RAMAN; WEIR; BLOOMFIELD, 1995) e *in vivo* (ENSHAIEH *et al.*, 2007; KIM; SHIN, 2013; KWON *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2011; YOO *et al.*, 2003). Em relação aos estudos clínicos, alguns autores observaram eficácia semelhante ou superior quando em comparação a ativos amplamente utilizados na terapêutica. Além disso, existem relatos da diminuição significativa de eventos adversos quando do uso do OM em detrimento a fármacos sintéticos (HAMMER, 2015; PAZYAR *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que o OM em sua forma pura apresenta relativa fototoxicidade e potencial alergênico no que se refere ao uso tópico (FLORES, 2011). Neste contexto, Rutherford e colaboradores (2007) analisaram retrospectivamente 2320 pacientes submetidos ao teste de contato e verificaram prevalência de 1,8% de reações alérgicas nos pacientes em uso de óleo de *Melaleuca* nas concentrações de 5 a 10% (v/v). Os autores relataram que os agentes sensibilizantes são, principalmente, produtos de degradação dos componentes do óleo, como peróxidos, epóxidos e endoperóxidos, os quais são formados a partir da exposição ao ar, à luz, umidade e calor (FLORES *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2013; RUTHERFORD *et al.*, 2007).

Outro aspecto relevante se refere à volatilidade apresentada pelo óleo, o que denota a importância da escolha de formulação e/ou material de acondicionamento adequados para que não haja comprometimento da eficácia do mesmo. Sob essa ótica, estudos científicos apontam que os carreadores nanométricos, tais como os lipossomas, as nanoemulsões, bem como as nanopartículas lipídicas ou poliméricas são capazes de incrementar os parâmetros de estabilidade, eficácia e segurança do óleo de *Melaleuca* (FLORES *et al.*, 2011; GE; GE, 2015). Por outro lado, tais sistemas podem favorecer a liberação sítio-específica de ativos encapsulados (LAUTERBACH; MULLER-GOYMANN, 2015) o que seria benéfico no tratamento da acne vulgar (CASTRO *et al.*, 2011).

2.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é vista atualmente como um dos ramos mais promissores no campo científico e com rápido avanço nos últimos anos (BERGMANN, 2008; PEREIRA; BINSFELD, 2013). Essa ciência compreende a concepção, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas que têm propriedades físicas, químicas e biológicas singulares, com forma e tamanho na escala nanométrica para o controle e manipulação da matéria estruturada nos níveis atômico e molecular (PEREIRA; BINSFELD, 2013; VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013).

Dessa forma, as propriedades dos materiais nanoestruturados são significativamente diferentes daquelas observadas na escala micro- ou macroscópica e apresentam um potencial de aplicações com benefícios nas mais diversas áreas (BERGMANN, 2008; BULCÃO, 2013; DIMER *et al.*, 2013; VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013), desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica (BERGMANN, 2008; FAROKHZAD; LANGER, 2009; MARTINS *et al.*, 2015; SANTOS, 2012).

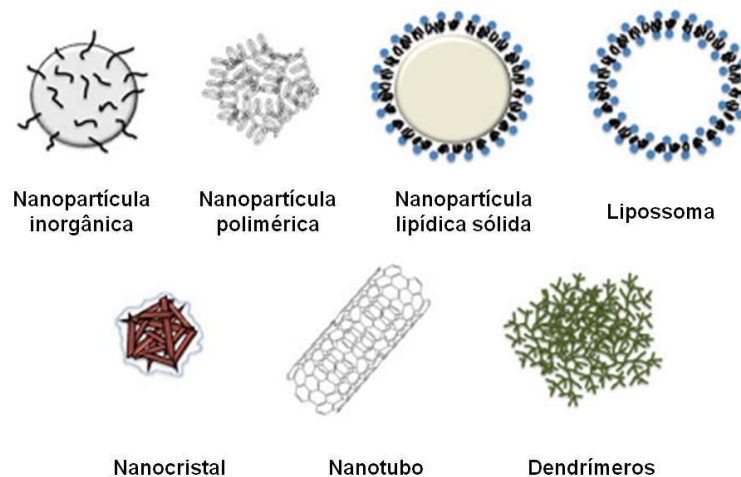
Dados relacionados aos investimentos em nanociência e nanotecnologia mostram que países como os Estados Unidos da América, Japão e alguns representantes da Comunidade Europeia, notadamente Alemanha, Inglaterra e França, lideram financiamentos para o desenvolvimento desse setor, aumentando a competitividade de suas empresas (DIMER *et al.*, 2013). No Brasil, a área de nanotecnologia vem se desenvolvendo, com apoio do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) a empresas e laboratórios que atuam no setor. Nesse sentido, em 2012, foi criado um sistema de laboratórios direcionado à pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) em nanociências e nanotecnologia (SisNANO). O investimento estimado de 2012-2015 foi de R\$ 110 milhões (BRASIL, MCTIC, 2012). Em 2018, o MCTIC estimou que o mercado brasileiro de nanotecnologia seja cerca de R\$ 200 milhões (AGÊNCIA CNI DE NOTÍCIAS, 2018).

Em um levantamento realizado pela Confederação Nacional da Indústria (CNI) em 2018 revelou que 73% das pequenas e médias empresas pesquisadas manifestaram interesse em utilizar a nanotecnologia para melhorar seus processos produtivos ou produtos. Empresas de diversos setores industriais participaram da pesquisa, incluindo agrícola; alimentos e bebida; cerâmica; vestuário; construção civil; cosméticos; embalagem; energia; farmacêutico; madeira e móveis; metalomecânico; plástico; químico; tecnologia da informação; têxtil; e vidros (AGÊNCIA CNI DE NOTÍCIAS, 2019).

Um dos segmentos da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carregamento e liberação de fármacos (BERGMANN, 2008). Tais sistemas são considerados estratégicos no desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que podem otimizar as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas indesejáveis das substâncias ativas, como baixa solubilidade e/ou permeabilidade, além de minimizar reações de degradação/metabolização enzimática ou não enzimática de fármacos, contornando, dessa forma, o inconveniente da baixa biodisponibilidade após sua aplicação *in vivo* (VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013). Por outro lado, a possibilidade do controle da liberação, de redução da dose e do direcionamento do ativo pode ser alcançada por meio da utilização da nanotecnologia, o que contribui para a segurança e eficácia terapêuticas.

Os nanosistemas para veiculação de fármacos podem variar enormemente em termos de composição e estrutura, sendo um grupo muito heterogêneo de materiais (VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013). Dentre esses, destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas inorgânicas; dendrímeros; nanoemulsões, nanocristais e nanopartículas poliméricas (Figura 7).

Figura 7 – Ilustração esquemática de diferentes tipos de nanoestruturas.



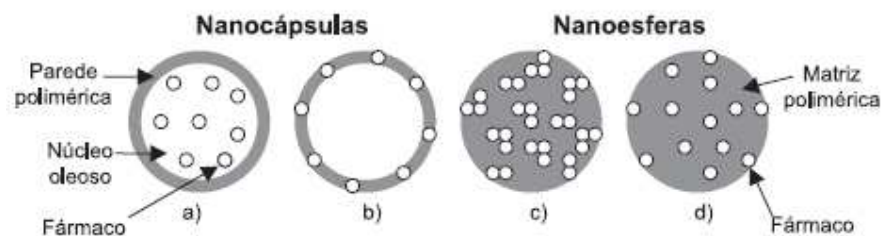
Fonte: BULCÃO, 2013

2.3.1 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas (NP) são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a $1\mu\text{m}$ (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), sendo caracterizados por sua estrutura físico-química, a qual é composta, essencialmente, por polímeros (VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013). O termo nanopartícula inclui, dentre outras, as

nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 8), as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (MARINI, 2014; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas são constituídas por um filme ou invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco é uniformemente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, podendo encontrar-se retido ou adsorvido (MARINI, 2014; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VIEIRA; TAVARES; REDIGUIERI, 2013).

Figura 8 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Legenda: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003

As nanopartículas constituídas por polímeros apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e em condições de armazenamento, quando comparadas com outros sistemas coloidais, como lipossomas, devido às matérias-primas empregadas na sua produção, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento (BERGMANN, 2008; MARINI, 2014).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (por exemplo, o cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados, tais como o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), os copolímeros do ácido metacrílico, além da poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (COUVREUR, *et al.*, 2002).

Dentre os métodos citados, é crescente a utilização do método de precipitação do polímero pré-formado, também conhecido por nanoprecipitação, proposto por Fessi e

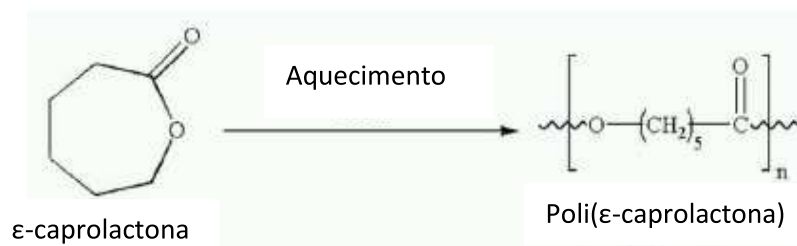
colaboradores em 1988, para o preparo de nanocápsulas poliméricas (BADRI *et al.*, 2017; BALEST, 2013; HÄRTER *et al.*, 2014; KÜLKAMP *et al.*, 2009; LIMA; ALBUQUERQUE, 2012; LOUCHARD; SILVA; LEAL, 2014; MARTÍNEZ-RIVAS *et al.*, 2017; MÜLLER *et al.*, 2004; STECANELLA, 2011). As nanocápsulas obtidas por essa metodologia apresentam estabilidade satisfatória e, além disso, propiciam elevada porcentagem de encapsulação de fármacos lipofílicos (ANGELI, 2007; ASSIS *et al.*, 2012; BRUINSMANN, 2016; HÄRTER, 2013; POHLMANN *et al.*, 2013).

Nesse método, o polímero, bem como os componentes hidrofóbicos (óleo, tensoativo lipofílico e ativo a ser encapsulado) são previamente dissolvidos em solvente orgânico. Posteriormente, essa fase oleosa é vertida, sob agitação, sobre fase aquosa constituída de água e tensoativo hidrofílico. Com isso, há a emulsificação espontânea do sistema, com formação de gotículas da fase oleosa com diâmetro nanométrico. Finalmente, executa-se a evaporação do solvente orgânico e do excesso de água (FESSI *et al.*, 1988). Apesar de ser considerado um processo relativamente simples, a nanoprecipitação envolve um fenômeno interfacial complexo. Com a adição da fase orgânica à fase aquosa, o solvente orgânico difunde-se no solvente aquoso e o polímero, insolúvel tanto no solvente aquoso quanto no núcleo oleoso, é adsorvido na interface destes componentes imiscíveis, onde se deposita formando a membrana das nanocápsulas. Dessa forma, o polímero atua como barreira e auxilia na estabilização da emulsão formada (ANGELI, 2007; STAINMESSE *et al.*, 1995).

Para a obtenção de nanocápsulas poliméricas pelo método descrito, são utilizados mais comumente triglicerídeos de cadeia média, tais como os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Mygliol[®]) como núcleo oleoso, além da associação de tensoativos com valores de EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) discrepantes, por exemplo, o monooleato de sorbitan etoxilado (Tween 80, EHL = 15,0) e o monooleato de sorbitan Span 80 (EHL = 4,3). Por sua vez, o polímero mais amplamente utilizado na composição desses sistemas nanoparticulados é a poli(ϵ -caprolactona) (LEITE, 2006; SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero semicristalino, cuja síntese baseia-se na abertura do anel do monômero cíclico ϵ -caprolactona (Figura 9), seguido da polimerização. Normalmente, a reação de polimerização espontânea da lactona é lenta para a formação de polímeros de alto peso molecular, tornando-se necessário o uso de catalisadores (RAMOS, 2018). Essa reação pode ser utilizada para uma grande variedade de catalisadores e mecanismos (aniônicos, catiônicos, de coordenação e radicais) que afetam a distribuição do peso molecular, a composição do grupo final e a estrutura química do polímero (AZIMI *et al.*, 2014).

Figura 9 - Polimerização de abertura de anel de ϵ -caprolactona para poli(ϵ -caprolactona)



Fonte: ADAPTADO DE AZIMI *et al.*, 2014.

As principais vantagens da PCL incluem suas características de biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, a possibilidade de permitir a liberação controlada de fármacos, além de elevada estabilidade e custo relativamente baixo. Devido a essas características, esse polímero possui aprovação da Agência Regulatória Norte-Americana (*Food and Drug Administration - FDA*) para uso em humanos (AZIMI *et al.*, 2014; BALEST, 2013). Nesse contexto, existem relatos do preparo de nanocápsulas poliméricas compostas por poli(ϵ -caprolactona) para a encapsulação de fármacos sintéticos (CAZO *et al.*, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), substâncias de origem vegetal (BALEST, 2013; LOUCHARD; SILVA; LEAL, 2014; SPAREMBERGER *et al.*, 2013), além de genes, peptídeos e proteínas (LU; LIU, 2017; MAHAPATRO; SINGH, 2011; PALMIERO *et al.*, 2018).

Em relação ao tratamento da acne vulgar, no trabalho de Lara (2008) foram desenvolvidas nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) para a encapsulação do ácido retinóico (tretinoína) com resultados promissores em relação à liberação controlada de tretinoína para aplicação tópica. De maneira semelhante, Ourique e colaboradores (2011) prepararam nanocápsulas poliméricas à base de PCL contendo tretinoína visando ao incremento da fotoestabilidade e diminuição da penetração cutânea desse ativo. Nesse estudo, foi constatado que a nanoestruturação foi capaz de promover proteção do fármaco frente à radiação UVA, além de controlar a permeação do ativo na pele.

Pereira e colaboradores (2016) desenvolveram nanocápsulas de PCL contendo os ativos adapaleno e dapsona co-encapsulados para aplicação tópica no tratamento da acne vulgar. Nesse estudo, o sistema nanoestruturado desenvolvido foi incorporado em veículo gelificado (gel de Carbopol[®]) e foram avaliadas as características físico-químicas, o potencial tóxico, bem como a permeação cutânea *in vitro* da formulação proposta. A formulação mostrou resultados adequados quanto à eficiência de encapsulamento, morfologia e características reológicas. E, ainda, estudos de penetração cutânea *in vitro* indicaram que

quantidades ínfimas dos ativos foram detectadas no compartimento receptor. No entanto, por meio do ensaio HET-CAM, o sistema nanocarreador foi classificado como irritante.

No que diz respeito à encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* (OM), Flores (2011) desenvolveu nanocápsulas de PCL contendo OM e avaliou as características físico-químicas e de estabilidade da formulação, além da proteção proporcionada pelo nanossistema em relação à volatilização do óleo. Em relação às atividades biológicas, foram avaliadas as atividades antifúngicas das nanocápsulas, bem como os efeitos antiedematogênico e cicatrizante após a incorporação dos nanocarreadores em hidrogel à base de Carbopol[®]. As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram diâmetro médio de 212 nm, característica monodispersa (IP = 0,17), potencial Zeta negativo (-13,5 mV), elevada eficiência de incorporação do ativo (cerca de 96%) e capacidade de minimizar a perda do óleo por volatilização. Além disso, apresentaram maior eficiência em relação à redução do crescimento do fungo *Trichophyton rubrum*, microrganismo causador da onicomicose, quando em comparação ao óleo isoladamente. Dessa forma, a formulação semissólida contendo as nanocápsulas mostrou-se promissora para aplicação dermatológica.

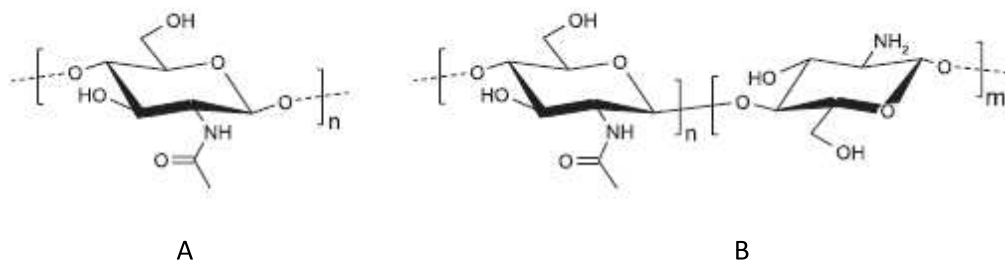
Pelo exposto, a estratégia de utilização de nanocápsulas constituídas por poli(ϵ -caprolactona) para a encapsulação do óleo de Melaleuca visando o tratamento da acne vulgar mostra-se promissora. Sob essa perspectiva, é interessante ressaltar alguns estudos da literatura nos quais a superfície dessas nanopartículas é modificada por polímeros dotados de atividade biológica, como a quitosana e seus derivados, objetivando o aumento da ação farmacológica do ativo encapsulado (ARAÚJO, 2009; CÉ, 2016; HAAS *et al.*, 2005; JESUS *et al.*, 2017; PRADO *et al.*, 2017). No caso específico da acne, onde existe a preocupação crescente em relação à resistência bacteriana, os protocolos clínicos padronizam a associação de fármacos em detrimento à monoterapia. Portanto, o desenvolvimento de nanocápsulas de PCL contendo óleo de Melaleuca revestidas por quitosana pode constituir estratégia interessante, uma vez que esse polímero apresenta, dentre outras, atividade antimicrobiana (FRIEDMAN *et al.*, 2013).

2.4 QUITOSANA

A quitosana (Figura 10B) é um copolímero derivado da quitina constituído por unidades de β -(1,4) 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1,4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. Tal polímero pode ser obtido a partir da desacetilação da quitina (Figura 10A), a qual é considerada o segundo

polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Tal polissacarídeo é encontrado, ainda, em nematóides e parede celular de fungos e leveduras. Nesse sentido, relata-se na literatura que a quitosana, assim como sua precursora, pode estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Figura 10 – Estrutura molecular da quitina (A) e quitosana (B)



Fonte: SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006

A quitosana encontra-se disponível em diferentes faixas de massa molecular (50 kDa - 2000 kDa) e graus de desacetilação (40% - 98%), os quais variam de acordo com os tipos e condições de polimerização e desacetilação (MARINI, 2014). Adicionalmente, apresenta características de base fraca com valores de pK_a entre 6,3 e 7,0, tornando-se solúvel em soluções de ácidos fracos ($pH < 6,5$) devido à protonação dos grupos amino, gerando o íon NH_3^+ . Nesse sentido, o ácido acético é o solvente mais empregado para sua solubilização. No entanto, a quitosana torna-se insolúvel em pH neutro ou alcalino, pois os grupos amino de sua molécula são desprotonados e o polímero perde suas cargas (CHUNG *et al.*, 2004; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MARINI, 2014; MENDES *et al.*, 2011).

A quitosana hidrossolúvel e carregada positivamente é capaz de interagir com superfícies carregadas negativamente, como as membranas celulares, permitindo sua utilização como biomaterial na forma de nano ou micropartícula, gel e membrana em diversas aplicações, incluindo veículo para liberação controlada de fármacos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Além de apresentar vantagens como biocompatibilidade e biodegradabilidade, características importantes no se refere ao seu emprego na área biomédica (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MARINI, 2014).

Dentre as atividades biológicas da quitosana, destaca-se a ação antibacteriana e antifúngica. O mecanismo de ação envolvido nesta atividade é influenciado por diferentes

fatores, sendo os mais importantes o tipo de microrganismo, o peso molecular e o grau de desacetilação. A principal interação quitosana-microrganismo é do tipo eletrostática, e ocorre entre as cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana e as moléculas carregadas negativamente da superfície celular do microrganismo (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Essas interações provocam diminuição da estabilidade osmótica, ruptura da membrana e eventual vazamento de elementos intracelulares, resultando na morte celular. Além disso, a quitosana pode penetrar nos núcleos de bactérias e fungos e inibir a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas por ligação ao DNA microbiano (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Sob essa perspectiva, estudos da literatura demonstraram a atividade antimicrobiana da quitosana frente a vários agentes microbianos incluindo *Escherichia coli* (CHEN *et al.*, 2002; SANPUI *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus* (JIA *et al.*, 2001; QI *et al.*, 2005; RIDOLFI *et al.*, 2012) e *Cutibacterium acnes* (FRIEDMAN *et al.*, 2013; RIDOLFI *et al.*, 2012).

Mais especificamente para bactérias Gram (+), a quitosana liga-se não covalentemente com ácidos teicóicos incorporados na camada de peptidoglicano. Esses ácidos na superfície celular são importantes para a divisão celular e outros aspectos fundamentais da fisiologia bacteriana. Muito provavelmente, a interação eletrostática da quitosana com esses componentes perturba o funcionamento dos mesmos, o que possivelmente leva a uma ruptura do funcionamento celular (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). A importância do ácido teicoico em relação à atividade da quitosana foi demonstrada por meio de utilização de espécies mutantes de *S. aureus* que não possuíam um ou mais genes envolvidos na biossíntese desses ácidos teicóicos. Nesse estudo, foi demonstrado que tais espécies foram mais resistentes a esse biopolímero quando comparado ao tipo selvagem. Esses resultados mostram o relevante papel dos ácidos teicóicos polianiônicos na atividade antibacteriana da quitosana em relação às bactérias Gram (+) (RAAFAT *et al.*, 2008).

Relata-se, também, que a quitosana possui algumas funções imunológicas, incluindo inibição de citocinas pró-inflamatórias, promoção da granulação tecidual por meio do recrutamento de fibroblastos e produção de colágeno tipo III (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Além disso, esse polímero é capaz de inibir a ativação e a expressão da metaloproteinase-2 da matriz em fibroblastos humanos, estimulando a cicatrização dos tecidos. Para mais, a quitosana promove a produção do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e do fator de crescimento derivado de plaquetas por monócitos humanos derivados de macrófagos envolvidos na resposta inflamatória. Adicionalmente, estudos descrevem sua capacidade em aumentar a produção de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulante de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico (NO) e

interleucina-6 (IL-6) em macrófagos, contribuindo para a ação anti-inflamatória e anti-tumoral. Além disso, os oligômeros de quitosana estimulam a liberação de TNF- α e de IL-1 β , salientando o seu efeito imunoestimulador (TAVARIA, 2013).

Em relação à aplicação da quitosana para o tratamento da acne vulgar, Friedman e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de quitosana-alginato e avaliaram as propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias *in vitro*, além da viabilidade de utilização desses carreadores para a encapsulação do peróxido de benzoíla, fármaco amplamente utilizado para o tratamento tópico da acne. As nanopartículas desenvolvidas apresentaram eficácia frente à *C. acnes*, o que foi constatado por meio da visualização do rompimento da membrana celular do microrganismo, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, além de atividade anti-inflamatória. Nesse estudo, foi observada a redução da produção de citocinas por monócitos e queratinócitos estimulados com a *C. acnes*. Em contrapartida, por meio da encapsulação do peróxido de benzoíla às nanoestruturas foi possível a obtenção de atividade antimicrobiana *in vitro* superior àquela observada para o fármaco livre.

Considerando as atividades biológicas apresentadas e diante das propriedades de adesividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, a quitosana tem se destacado como material potencialmente atraente para uso farmacêutico, especialmente em sistemas de liberação modificada de fármacos (TAVARES, 2013). Nesse contexto, é importante ressaltar que, quando sob a forma nanoestruturada, a quitosana apresenta maior relação superfície/volume, o que implica em maior densidade de carga superficial, possibilitando o incremento da afinidade pela superfície celular dos microrganismos e, conseqüentemente, maior atividade biológica (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Portanto, a inclusão desse polímero na superfície das nanocápsulas desenvolvidas no presente trabalho poderá contribuir para o controle da liberação, bem como em relação ao aumento da atividade do ativo encapsulado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona)-quitosana contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* para o tratamento tópico da acne vulgar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo comercial de *Melaleuca alternifolia* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
- Desenvolver nanocápsulas poli (ϵ -caprolactona) contendo óleo de *Melaleuca alternifolia* pelo método de precipitação interfacial do polímero pré-formado;
- Revestir as nanocápsulas desenvolvidas com o polímero quitosana;
- Caracterizar as nanocápsulas desenvolvidas com base nos seguintes parâmetros: diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial Zeta, pH, eficiência de encapsulação e morfologia;
- Avaliar a viabilidade *in vitro* das nanocápsulas desenvolvidas utilizando linhagem celular NIH/3T3 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos);
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das nanocápsulas desenvolvidas frente à cepa de *Cutibacterium acnes*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi adquirido junto à Ferquima Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, SP, Brasil), lote 198, especificações aprovadas (laudo técnico em anexo), origem Austrália e obtido por destilação a vapor das folhas. A poli (ϵ -caprolactona) (peso molecular = 80.000 g/mol), a quitosana (baixo peso molecular: 50,000-190,000 Da; Grau de desacetilação: 75-85%), o monooleato de sorbitano, o cloreto de iodonitrotetrazólio (INT), *Phosphate buffered saline* (PBS), padrão de *n*-alcanos C7-C30 e padrão de Terpinen-4-ol ($\geq 95\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80) foi fornecido pela DEG (São Paulo, SP, Brasil) e os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico pela Engenharia das essências (São Paulo, SP, Brasil). A acetona foi comprada da Anitrol (Diadema, SP, Brasil), o hexano grau CG e do hexano P.A. da Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil) e o ácido acético glacial da All Chemistry (São Paulo, SP, Brasil). Os meios de cultura caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e ágar *Brain Heart Infusion* (BHA) foram obtidos na Kasvi (São Jose dos Pinhais, PR, Brasil), o *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) *high* glicose, o Soro Bovino Fetal (SBF), a solução de antibiótico Penicilina/Estreptomicina e a solução de Tripsina/EDTA 2,5% foram adquiridas da Gibco (Waltham, MA, EUA). O Azul de Trypan e o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O meio Nutriente HAM F-12 foi adquirida da Cultilab (Campinas, SP, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

A caracterização do óleo essencial de *M. alternifolia* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japão) da Central Analítica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A metodologia de análise foi adaptada de Viccini *et al.* (2014). Utilizou-se coluna capilar RTX-5MS (5% difenil/ 95% dimetil polisiloxano - 60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m) (Restek, Bellefonte, PA, EUA) com gás portador de hélio (1,0 mL/min). A temperatura foi programada para variar de

50 (5 min) a 200 °C, com rampa de 4 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200°C e da interface foi de 220°C. O óleo foi diluído em hexano grau CG e 1 µL foi injetado em modo split (1:10). A energia de ionização por impacto de elétrons foi de 70 eV. A identificação dos componentes ocorreu com base no índice de retenção (IR) calculado através da injeção de um padrão de *n*-alcanos C7-C30 e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados ao banco de dados do sistema (NIST08 Mass Spectral Library) e com a literatura (ADAMS, 2007; MIRANDA, 2014; MEDEIROS, 2014; NICARETA, 2006; SILVA, 2007; SOUZA, 2014; SWORDS, HUNTER, 1978; VIEGAS, BASSOLI, 2007; WEBBOOK NIST, 2018).

4.2.2. Desenvolvimento das nanocápsulas

4.2.2.1 Preparação das nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas (n = 3) pelo método de precipitação interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). A composição quali-quantitativa das nanocápsulas brancas (sem a inclusão do ativo - NC) (SIQUEIRA, 2008), bem como das nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* (NC-OM) está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas

	Composição	NC	NC-OM
Fase orgânica	Acetona	27 mL	27 mL
	Poli (ϵ -caprolactona)	0,100 g	0,100 g
	Monooleato de sorbitano (Span 80)	0,077 g	0,077 g
	Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico	0,333 g	0,083 g
	Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	---	0,250 g
Fase aquosa	Água destilada	53 mL	53 mL
	Monooleato de sorbitano Etoxilado (Polissorbato 80)	0,077 g	0,077 g

Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Inicialmente, todos os componentes foram medidos ou pesados e reservados até o uso. Para a fase orgânica, adicionou-se em béquer a poli (ϵ -caprolactona) e a acetona, sob agitação magnética (500 rpm) à temperatura de 37 °C, até completa dissolução do polímero. Posteriormente, acrescentou-se o monooleato de sorbitano, a mistura de triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico e o óleo essencial de *M. alternifolia*, conservando a agitação e temperatura. Para a fase aquosa, tomou-se um béquer, adicionou-se a água destilada e o polissorbato 80, sendo homogeneizados por agitação magnética a 500 rpm e temperatura de 40°C. Em seguida, gotejou-se a fase orgânica sobre a fase aquosa através de bureta graduada (60 gotas/minuto) sob agitação (500 rpm) e temperatura 37°C. O sistema foi mantido sob tais condições por 10 minutos. Finalmente, a suspensão foi concentrada por eliminação do solvente orgânico e parte da água utilizando-se evaporador rotativo (Rotavaporador R210-2015, Büchi, Flawil, Suíça) com velocidade de rotação de 60 rpm e temperatura de 35 °C (FLORES, 2011). O volume final foi fixado em 10 mL para obtenção da concentração de óleo encapsulado igual a 2,5% (p/v). Para o preparo da suspensão de nanocápsulas brancas (n = 3) foi adotado o mesmo procedimento, omitindo-se a etapa de introdução do OM.

4.2.2.2 *Revestimento das nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* com quitosana*

Para preparo das nanocápsulas revestidas (NC-OM-QT) procedeu-se, primeiramente, a solubilização da quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação (600 rpm) por 1 hora, de modo a obter-se soluções de quitosana com concentrações iguais a 0,5%, 1% ou 2% (p/v) (CALVO *et al.*, 1997; SIQUEIRA, 2008). Posteriormente, o revestimento foi realizado por meio de gotejamento (40 gotas/minuto) da solução de quitosana [0,5%, 1% ou 2% (p/v)] sobre a suspensão de nanocápsulas previamente obtida, com auxílio de seringa de 10 mL e agulha 25mm x 0,7mm. Finalmente, o sistema foi mantido sob agitação (500 rpm) por 1 hora à temperatura ambiente.

4.2.3 **Caracterização físico-química e morfológica das nanocápsulas**

4.2.3.1 *Determinação do Diâmetro médio, Índice de Polidispersidade (IP) e Potencial Zeta*

O diâmetro médio e o IP foram avaliados empregando-se a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering DLS*) utilizando um ângulo de incidência do

laser em relação à amostra de 173°. O potencial Zeta foi determinado por meio da avaliação da mobilidade eletroforética. Para as leituras, as amostras foram filtradas em papel de filtro com porosidade de 3,0 µm (Nalgon, Itupeva, SP, Brasil) e diluídas (1:400 v/v) em água ultrapura. As determinações foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) pertencente ao Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG, Brasil).

4.2.3.2 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões de NC, NC-OM e NC-OM-QT foram determinados diretamente nas amostras à temperatura ambiente usando um pHmetro portátil (PH-2011, Etekcity, Anaheim, Califórnia, EUA) calibrado.

4.2.3.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A EE do óleo de Melaleuca nas suspensões de nanocápsulas revestidas ou não com quitosana foi determinada indiretamente por meio do método de ultrafiltração-centrifugação (MIRANTE, 2015). Para tanto, foi quantificado o Terpinen-4-ol, marcador químico principal do óleo em estudo. Tal quantificação foi realizada no resíduo proveniente da rotavaporação, com o intuito de avaliar-se possível perda desse marcador durante o processo, bem como nas formulações desenvolvidas.

4.2.3.3.1 Quantificação do Terpinen-4-ol no resíduo da rotavaporação

Para essa análise, resíduos provenientes do processo de preparo das NC-OM (n = 3) foram adicionados em funil de separação juntamente com 30 mL de hexano P.A. procedendo-se à extração líquido-líquido. A fração hexânica foi recolhida em balão volumétrico fechado e armazenada até a análise. A amostra foi homogeneizada e filtrada em algodão na presença de sulfato de sódio anidro (QHEMIS, Judiaí, SP, Brasil) com auxílio de pipeta de Pasteur de vidro para frasco de vidro de 2 mL. Para a análise em CG-EM, tomou-se 100 µL da amostra e 400 µL de hexano grau CG. O padrão de Terpinen-4-ol foi pesado e diluído em hexano grau CG para a concentração de 0,14 mg/mL. A programação do CG-EM foi realizada igualmente descrita no item 4.2.1 para as amostras e para o padrão Terpinen-4-ol. A concentração do Terpinen-4-ol presente na amostra foi obtida por meio da seguinte Equação 1:

Equação 1 - Cálculo da concentração de Terpinen-4-ol na amostra.

$$C_{\text{amostra}} = \frac{C_{\text{padrão}} \cdot A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}}$$

Em que:

C_{amostra} = Concentração de Terpinen-4-ol na amostra; $C_{\text{padrão}}$ = Concentração da solução do padrão de Terpinen-4-ol; A_{amostra} = Área do pico correspondente ao Terpinen-4-ol presente na amostra; $A_{\text{padrão}}$ = Área do pico correspondente ao Terpinen-4-ol no padrão.

4.2.3.3.2 Quantificação do Terpinen-4-ol nas nanocápsulas

Nesse caso, as suspensões (NC-OM e NC-OM-QT) foram diluídas (1:100, v/v) em água ultrapura e alíquotas (n = 3) foram transferidas para unidades de ultrafiltração Amicon (MWCO 10.000, Milipore, Alemanha) e centrifugadas (Eppendorf® 5810R, Alemanha) à 3.500 rpm por 30 minutos (NC-OM) ou 50 minutos (NC-OM-QT). Após a separação, pipetou-se 1 mL do ultrafiltrado para frasco de vidro, adicionou-se 500 µL de hexano grau CG e procedeu-se a extração líquido-líquido por agitação em vórtex (Vortex-Genie 2, Ciencor, São Paulo, SP, Brasil) por 30 segundos. Os frascos foram mantidos em repouso para separação das fases e, em seguida, a fase orgânica foi retirada e seguiu-se o procedimento adotado no item 4.2.3.3.1, com exceção do volume de análise que, para esta quantificação, foi 100 µL da amostra e 300 µL de hexano grau CG para a amostra sem adição de padrão, sendo adicionados 100 µL de solução intermediária de padrão, 100 µL da amostra e 200 µL de hexano grau CG para a amostra com adição de padrão.

Para o cálculo da EE utilizou a Equação 2:

Equação 2 – Eficiência de encapsulação (%)

$$EE (\%) = \frac{(CT_t - CT_r) - CT_u}{(CT_t - CT_r)} \times 100$$

Em que:

EE = Eficiência de encapsulação; CT_t = Concentração teórica de Terpinen-4-ol presente nas nanocápsulas; CT_r = Concentração de Terpinen-4-ol quantificado no resíduo da rotavaporação; CT_u = Concentração de Terpinen-4-ol quantificado no ultrafiltrado.

4.2.3.4 Avaliação morfológica

A avaliação morfológica das NC-OM e NC-OM-QT foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM - Nanosurf easyScan 2, Nanosurf Instruments, Liestal, Suíça) pertencente ao Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG, Brasil). As imagens de AFM foram obtidas via modo intermitente, à temperatura ambiente, empregando-se sonda de silício (Tap190Al-G, Budget Sensors) de comprimento 225 μm , com uma frequência de ressonância de 160-220 kHz, força constante de 28-75 N/m e raio da ponta <10 nm. As amplitudes de oscilação livres do cantilever eram tipicamente 100 mV e o tamanho de varredura da sonda do microscópio era de 13x13 μm e 20x20 μm . A resolução do AFM foi de 512x512 pixels. Para a análise das amostras, adicionou-se 10 μL de NC-OM (1:400 v/v) e NC-OM-QT (1:800 v/v) diluídas em água ultrapura sobre a superfície da mica, permanecendo por 24 h em dessecador. Posteriormente, realizou-se a secagem final com jato de nitrogênio. As imagens foram avaliadas utilizando o programa de análise de dados *Gwyddion* versão 2.5.

4.2.4 Caracterização biológica *in vitro* das nanocápsulas

4.2.4.1 Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas nanoestruturados (LDNano) na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.2.4.1.1 Cultura de células

A linhagem de fibroblastos NIH/3T3 (ATCC[®]CRL-1658[™]) e de queratinócitos (HaCaT), gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Frederico Pittella Silva do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. A linhagem de queratinócitos HaCaT foi cultivada em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) e Ham's F-12 (proporção 1:1) e linhagem de fibroblastos NIH/3T3 foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% da solução dos antibióticos [Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$)] em garrafas de cultura de

75 cm³ (KASVI) e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Panasonic, MCO-18ACL-PA, EUA) até atingirem 80% de confluência. Em seguida, removeu-se o meio, lavou-se com *Phosphate buffered saline* (PBS) e adicionou-se 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5% às garrafas de cultura dos fibroblastos e queratinócitos, as quais foram incubadas por 4 e 10 minutos, respectivamente, à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% da solução de antibióticos para inativação da enzima. Recolheu-se o meio contendo as células e transferiu-se para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL, procedendo a centrifugação à 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. As suspensões de células foram diluídas diretamente no corante Azul de Trypan 10x para a contagem em câmara de Neubauer para iniciar o ensaio de viabilidade celular.

4.2.4.1.2 Ensaio de viabilidade celular

O teste colorimétrico do MTT foi utilizado para mensurar a viabilidade das linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos, conforme Mossman (1983) com modificações. Para tanto, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5×10^3 células/poço para NIH/3T3 e 1×10^4 células/poço para HaCaT, foram incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, removeu-se o meio e adicionou-se 150 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) em cada poço. Em seguida, foram adicionados 50 µL das amostras (OM, NC, NC-OM e NC-OM-QT), previamente diluídas em solução de Tween 80 1% (v/v), de modo a obter-se concentrações de OM variando entre 0,0625 a 1,0 mg/mL (em quadruplicata). Como controles foram utilizados meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 (controle negativo), meio DMEM acrescido do solvente [solução de Tween 80 0,5% (v/v)] e solução de DMSO 5% (v/v) (controle positivo). As placas foram incubadas por 24 e/ou 48 horas à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado acrescido de 10 µL de solução de MTT à 5 mg/mL de coloração amarela, sendo incubada por 2:30 h à 37°C com 5%. Após, o precipitado de formazan, de coloração roxa, formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular

Devices, EUA) a 595 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com as diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorvâncias, considerando-se o valor médio da absorvância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

4.2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.2.4.2.1 Estirpe microbiana

As amostras foram avaliadas frente à cepa de *Cutibacterium acnes* (INCQS 000460), gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ). A cepa bacteriana foi cultivada em jarra de anaerobiose, a 35 ± 2 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com extrato levedura 0,5% e L-cisteína 0,05% por 48 horas antes de cada experimento.

4.2.4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM para as suspensões de NC, NC-OM, NC-OM-QT, bem como para o óleo essencial de *M. alternifolia* foram determinadas por técnica de macrodiluição em caldo conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – M100-S28, 2018; M11-A6, 2004) com adaptações. As concentrações para o óleo de Melaleuca, previamente diluído em DMSO a 1% (v/v), bem como para as formulações desenvolvidas, variaram de 0,0044 a 0,56% v/v obtidas por diluições sucessivas. Com controle positivo foi utilizado o fosfato de clindamicina devido ao seu uso no tratamento da acne. Nesse caso, as concentrações utilizadas variaram de 0,03 a 4 µg/mL. A. Em capela de fluxo laminar, transferiu-se 800 µL das amostras e 1000 µL de meio de cultura (caldo BHI suplementado) para tubos previamente identificados. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de inóculo [Concentração de 3×10^7 UFC/mL, partindo-se da suspensão bacteriana de 1 da escala turbidimétrica padrão de McFarland (3×10^8 UFC/mL)] para o volume final de 200 µL. Os

tubos foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas em jarra anaeróbia. Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o controle de crescimento (meio de cultura + microrganismo), controle do solvente (meio de cultura + microrganismo + DMSO 1%), controle negativo (meio de cultura somente), branco (meio de cultura + amostra) e controle positivo (meio de cultura + microrganismo + fármaco de referência). A CIM foi definida como a menor diluição capaz de inibir o crescimento bacteriano e foi detectada visualmente com auxílio do corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio). Para o teste, acrescentou-se 200 μL de INT 4 mg/mL em cada poço e incubou por 30 minutos, onde a cor amarela indica ausência de crescimento e a cor vermelha indica presença de crescimento bacteriano (BARBOSA, 2014).

Posteriormente, verificou-se o efeito bactericida ou bacteriostático na CIM das amostras. Para isso, foram transferidas alíquotas de 10 μL do meio de cultura dos poços considerados inibitórios (sem crescimento bacteriano visível) do ensaio de CIM para placa de Petri contendo ágar BHA, a qual foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h em jarra anaeróbia. Sendo observado, após o período de incubação, a ocorrência ou não do crescimento bacteriano.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

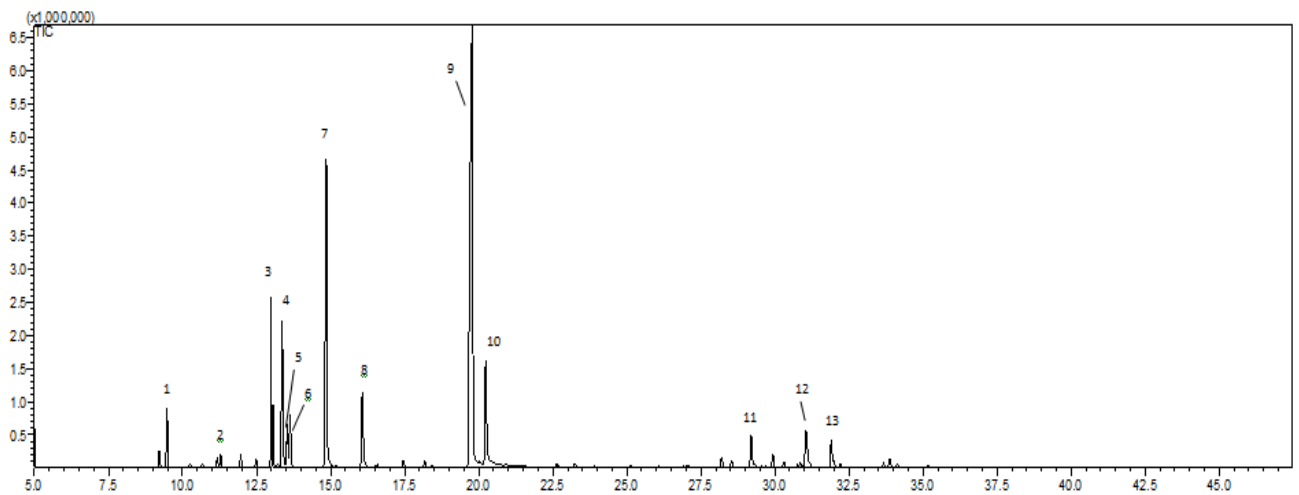
Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA)/Dunnett, considerando-se o nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*

Para a determinação dos componentes majoritários do óleo em estudo realizou-se a análise por CG-EM. A análise do perfil cromatográfico, integraram-se os picos com áreas acima de 50000, obtendo-se 57 picos e destes, foram identificados 13 picos referentes aos constituintes descritos na ISO 4730/2017, os quais representam 90,69% da composição total do óleo. Os dados são apresentados na Figura 11 e Tabela 3.

Figura 11 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Legenda: 1: α -Pineno, 2: Sabineno, 3: α -Terpineno, 4: ρ -Cimeno, 5: Limoneno, 6: 1,8-Cineol, 7: γ -Terpineno, 8: Terpinoleno, 9: Terpinen-4-ol, 10: α -Terpineol, 11: Aromadendreno, 12: Viridiflorene, 13: δ -Cadineno.

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Tabela 3 – Constituintes do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* descritos na ISO 4730/2017

Pico	Constituinte	^a FM	^b PM (g/mol)	^c t _R (min) ^a	% Área	ISO 4730:2017	^d IK _{CAL}	^e IK _{LIT}
1	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	9,475	2,31	1,0 - 4,0%	933	939*
2	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	136	11,175	0,41	Traços ⁺ - 3,5%	973	975*
3	α-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	13,017	8,19	6,0 - 12,0%	1017	1017*
4	ρ-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	13,362	6,56	0,5 - 8,0%	1025	1024*
5	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	13,537	1,89	0,5 - 1,5%	1029	1029*
6	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	13,628	2,25	Traços ⁺ - 10,0%	1031	1031*
7	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	14,851	16,32	14,0 - 28,0%	1060	1059*
8	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	136	16,069	3,80	1,5 - 5,0%	1089	1088*
9	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	19,774	37,11	35,0 - 48,0%	1182	1177*
10	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	20,234	6,07	2,0 - 5,0%	1193	1188*
11	Aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	29,196	1,74	0,2 - 3,0%	1445	1441 [#]
12	Viridiflorene	C ₁₅ H ₂₄	204	31,044	2,58	0,1 - 3,0%	1501	1497 [#]
13	δ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	31,902	1,46	0,2 - 3,0%	1529	1523 [#]
Total identificado (%)					90,69%			

Legenda: ^aFórmula Molecular; ^bPeso Molecular; ^cTempo de Retenção; ^dÍndice de Kovats calculado (com base na série homóloga de n-alcanos C7-C30); ^eÍndice de Kovats da literatura (*Adams, 2007; [#]Nicareta, 2006); ⁺ Traços <0,01%.

Fonte: Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Os resultados encontram-se dentro da faixa preconizada pela normatização ISO 4730/2017, padrão de qualidade internacional para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, com exceção do α-Terpineol e do Limoneno cujos valores situam-se ligeiramente acima de 5,0% e 1,5%, respectivamente (Tabela 3). Possivelmente, devido a degradação física ou química ou ainda isomerismo com outros constituintes do óleo. Nesse contexto, é importante ressaltar que, no caso de amostras de elevada complexidade e presença significativa de isômeros, a identificação de seus constituintes com base no tempo de retenção dos picos e nos espectros de massa obtidos pode levar a interpretações inadequadas (von MÜHLEN, 2009). Tal fato pode ser justificado considerando que o tempo de retenção varia conforme o comprimento da coluna, a composição química e a espessura da fase estacionária, as

temperaturas de operação, o fluxo e o tipo de gás carreador. Portanto, cromatógrafos idênticos, operados a partir de metodologias análogas e com os mesmos reagentes poderiam gerar diferentes tempos de retenção (MEDEIROS, 2014). Assim, a utilização dos índices de retenção constitui recurso essencial para minimizar esse inconveniente. Dessa forma, os Índices de Kovats para os diferentes constituintes do óleo essencial de *M. alternifolia* foram calculados e os resultados obtidos foram comparados àqueles disponibilizados na literatura (Tabela 3). A partir disso, a identificação dos constituintes pôde ser adequadamente realizada.

A ISO 4730 determina que o óleo apresente um teor mínimo de 35% de Terpinen-4-ol e um teor máximo de 10% de 1,8-Cineol (ISO, 2017). Neste trabalho foram encontrados valores adequados de Terpinen-4-ol (37,11%) e 1,8-Cineol (2,25%) no óleo analisado. Esses resultados são importantes não somente do ponto de vista da qualidade do óleo, mas também com relação à segurança e eficácia de sua utilização. Nessa perspectiva, o Terpinen-4-ol é referido como principal responsável pela ação biológica do óleo, sobretudo no que diz respeito à atividade antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2011). De modo que, quanto maior o teor de Terpinen-4-ol, melhor sua ação frente aos microrganismos (JESUS *et al.*, 2007). Por outro lado, recomenda-se concentração abaixo de 10% para o 1,8-Cineol por ser associado a irritação cutânea. Apesar disso, estudos demonstraram que esse constituinte pode aumentar a permeabilidade da membrana dos microrganismos, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo considerado, dessa forma, como detentor de efeito antimicrobiano marginal (HAMMER *et al.*, 2003). Adicionalmente, existem relatos de seu efeito inibitório sobre a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (JUERGENS *et al.*, 2004).

5.2 DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS

Para o desenvolvimento foi selecionado um nanocarreador composto por núcleo oleoso visando garantir adequada encapsulação do ativo e por polímeros que pudessem auxiliar na proteção do óleo frente à degradação por agentes extrínsecos (sobretudo luz e gases atmosféricos), bem como em relação ao controle da liberação do mesmo no sítio de administração. Adicionalmente, a partir da escolha do biopolímero quitosana, buscamos incrementar as atividades biológicas do óleo em estudo. Por outro lado, optou-se por preconizar constituintes comumente utilizados em formulações de uso tópico e/ou que apresentassem aprovação de agências regulatórias para uso em humanos. Dessa forma, foram desenvolvidas nanocápsulas à base de poli (ϵ -caprolactona), contendo como núcleo oleoso

triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e apresentando em sua constituição os tensoativos monooleato de sorbitano (Span 80) e monooleato de sorbitano etoxilado (Polissorbatato 80), as quais foram posteriormente revestidas por quitosana. O revestimento foi realizado com 2% de quitosana por exibir características físico-químicas mais adequadas a proposta do trabalho.

As formulações desenvolvidas apresentaram característica macroscópica homogênea e aspecto leitoso típico de dispersões coloidais e foram avaliadas em relação às suas propriedades físico-químicas, morfológicas e biológicas *in vitro*. Os resultados dessas determinações são apresentados a seguir.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA

5.3.1 Determinação do Diâmetro médio, Índice de Polidispersidade (IP), Potencial Zeta e pH

Na Tabela 4 estão representados os resultados referentes ao diâmetro médio, índice de polidispersidade (IP), potencial zeta e pH das nanocápsulas “brancas” (sem a presença do óleo de Melaleuca encapsulado - NC), daquelas contendo o referido óleo (NC-OM), assim como das NC-OM após o revestimento com quitosana (NC-OM-QT).

Tabela 4 – Valores* de diâmetro médio, IP, potencial zeta e pH das nanocápsulas.

	NC	NC-OM	NC-OM-QT
Diâmetro médio (nm)	298,4 ± 4,1	243,9 ± 1,6	268,0 ± 3,8
Índice de Polidispersidade	0,288 ± 0,9	0,180 ± 0,2	0,204 ± 0,9
Potencial Zeta	-32,7 ± 2,0	-29,5 ± 1,3	+31,0 ± 1,8
pH	6,11 ± 0,05	5,58 ± 0,10	5,06 ± 0,17

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

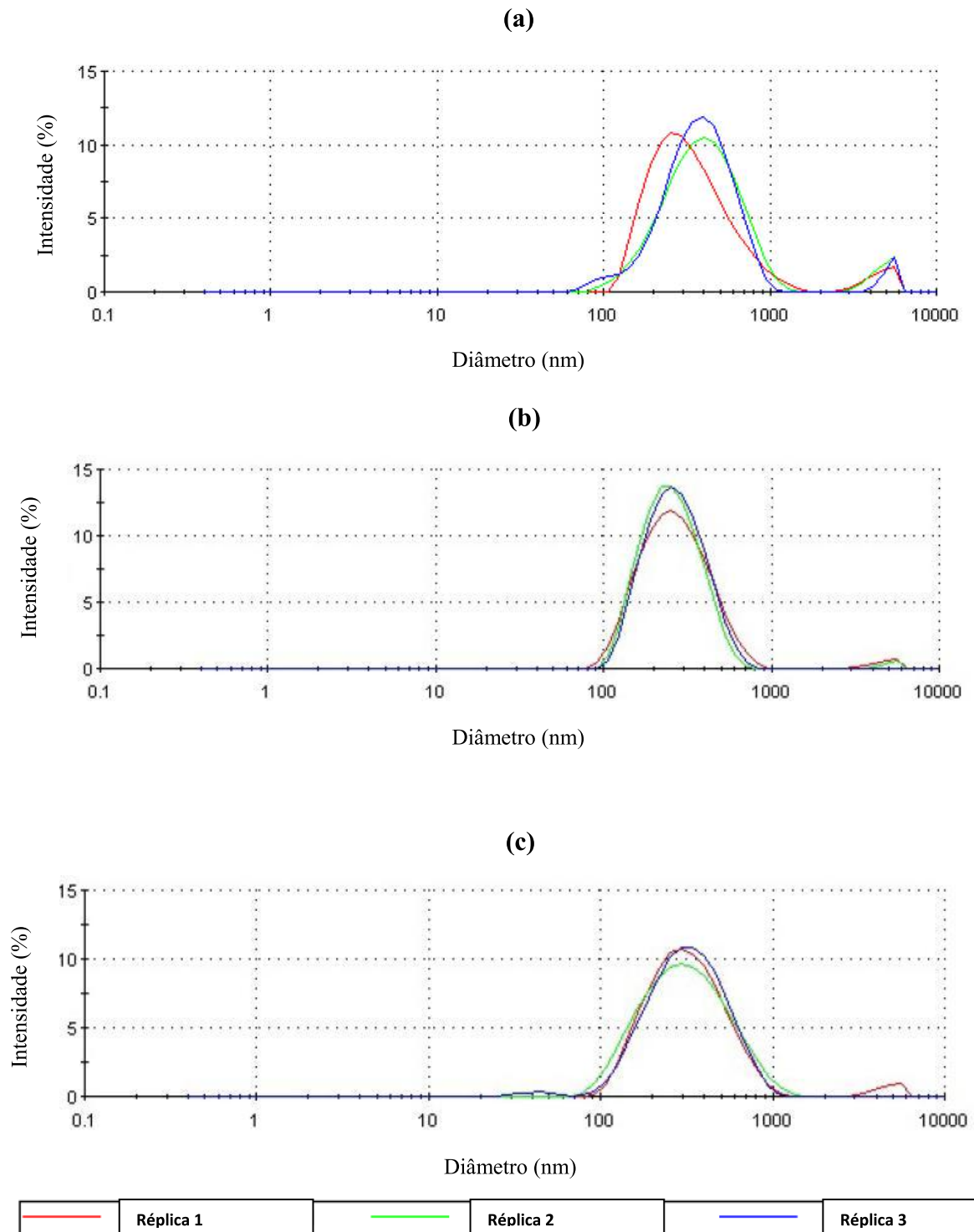
Fonte: Elaborada pela autora (2019)

As nanocápsulas “brancas”, bem como aquelas contendo o OM encapsulado apresentaram diâmetro médio entre 244 a 299 nm e estão de acordo com a variação de tamanho normalmente observada para nanopartículas preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (100 a 500nm) (SCHAFFAZICK, 2006). Por outro lado, pode-se perceber que as NC obtiveram valores de diâmetro maiores que as NC-OM. Isto se deve provavelmente à maior quantidade dos triglicerídeos de cadeia média na formulação das

NC quando em comparação à constituição das NC-OM (Tabela 2, p. 48). Esses triglicerídeos possuem cadeias laterais longas e, por conseguinte, ocupariam maior volume no núcleo oleoso. Em contrapartida, o OM é constituído por moléculas menores, que ocupariam um menor espaço na fase oleosa.

Adicionalmente, foi constatado um maior valor de IP para as nanocápsulas brancas ($0,288 \pm 0,9$) em detrimento àquelas contendo o OM ($0,180 \pm 0,2$) (Tabela 4). Esse resultado é corroborado a partir dos gráficos de distribuição de tamanho demonstrados na Figura 12, nos quais é possível perceber uma distribuição bimodal mais acentuada para as NC (Figura 12a). Tal fato pode ser igualmente considerado como forma de justificar o maior diâmetro médio obtido para essas partículas. Para explicar as diferenças nos valores de IP, teorizamos que esse padrão de distribuição possa ser devido ao excesso de tensoativos na fase aquosa, os quais se organizam sob a forma de micelas de tamanho micrométrico. Sob outra perspectiva, é possível que a presença do OM no núcleo das nanocápsulas tenha levado à modificação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) da fase oleosa, de forma que uma maior quantidade de tensoativos fosse requerida para estabilizar o sistema. Nesse caso, portanto, não haveria a presença significativa de estruturas micelares dispersas na fase externa e, dessa forma, uma distribuição unimodal e mais monodispersa foi alcançada (Figura 12b). Entretanto, é importante ressaltar que os valores de polidispersividade para ambas as formulações se situa abaixo de 0,3, o que, de acordo com a literatura, configura a obtenção de sistemas monodispersos (ANGELI, 2007; MARCO, 2009).

Figura 12 – Distribuição de tamanho das nanocápsulas por intensidade (n = 3).
 (a) NC; (b) NC-OM; (c) NC-OM-QT



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Ainda em relação aos resultados apresentados na Tabela 4 pode-se constatar que as nanocápsulas revestidas com quitosana (NC-OM-QT) apresentaram aumento no diâmetro em

comparação às nanocápsulas contendo OM não revestidas (NC-OM). Esse resultado está em concordância com dados obtidos em outros estudos da literatura (RIDOLFI *et al.*, 2012; TAVARES, 2013) e pode sugerir que o incremento de tamanho ocorreu devido à adsorção da quitosana à superfície das partículas. Além disso, foi observado um ligeiro aumento no valor de IP para as partículas revestidas quando em comparação às formulações NC-OM. Esse fato pode ser devido ao revestimento não homogêneo das nanocápsulas, o que possivelmente contribuiria para uma maior diversidade na distribuição do diâmetro das mesmas. De fato, o padrão de distribuição de tamanho reportado na Figura 12c mostra uma maior heterogeneidade desse parâmetro em contraste com as NC-OM (Figura 12a). Apesar disso, o valor de IP para a formulação revestida encontra-se abaixo de 0,3, o que, como já descrito, indica a obtenção de sistema monodisperso.

As nanopartículas possuem uma estrutura com superfície eletrostática, devido à dissociação de grupamentos dos polímeros ou pela adsorção preferencial de íons ou outras moléculas iônicas do meio aquoso da dispersão (ANGELI, 2007). O potencial Zeta é a medida que reflete o potencial de superfície dessas partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) e pela composição quali/quantitativa de seus constituintes, especialmente tensoativos e polímeros (MARCO, 2009). Nesse contexto, o potencial Zeta é um parâmetro importante para estimar a estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois elevados valores de carga de superfície (em módulo) conferem maior repulsão eletrostática entre às partículas, reduzindo a probabilidade de agregação, em função das colisões ocasionais das mesmas quando em suspensão (MARCO, 2009). Deste modo, partículas com valores de potencial Zeta maiores que 30 mV (em módulo) são consideradas estáveis (GUTERRES *et al.*, 2016; TAVARES, 2013). Por outro lado, existe relação direta entre a característica de superfície de nanocarreadores coloidais e sua interação com diferentes superfícies biológicas (VIEIRA, TAVARES, REDRIGUIERI, 2013). A esse respeito, com o intuito de prolongar o tempo de permanência de ativos na superfície da pele (negativamente carregada), alguns estudos têm proposto o revestimento de sistemas nanoestruturados, que em sua maioria possuem carga de superfície negativa, com materiais que promovam a inversão de cargas para valores positivos (SIQUEIRA, 2008). Dessa forma, o revestimento das nanocápsulas contendo o OM com a quitosana seria interessante para incrementar o tempo de permanência da formulação no local de administração, contribuindo, conseqüentemente, para a eficácia do tratamento antiacneico.

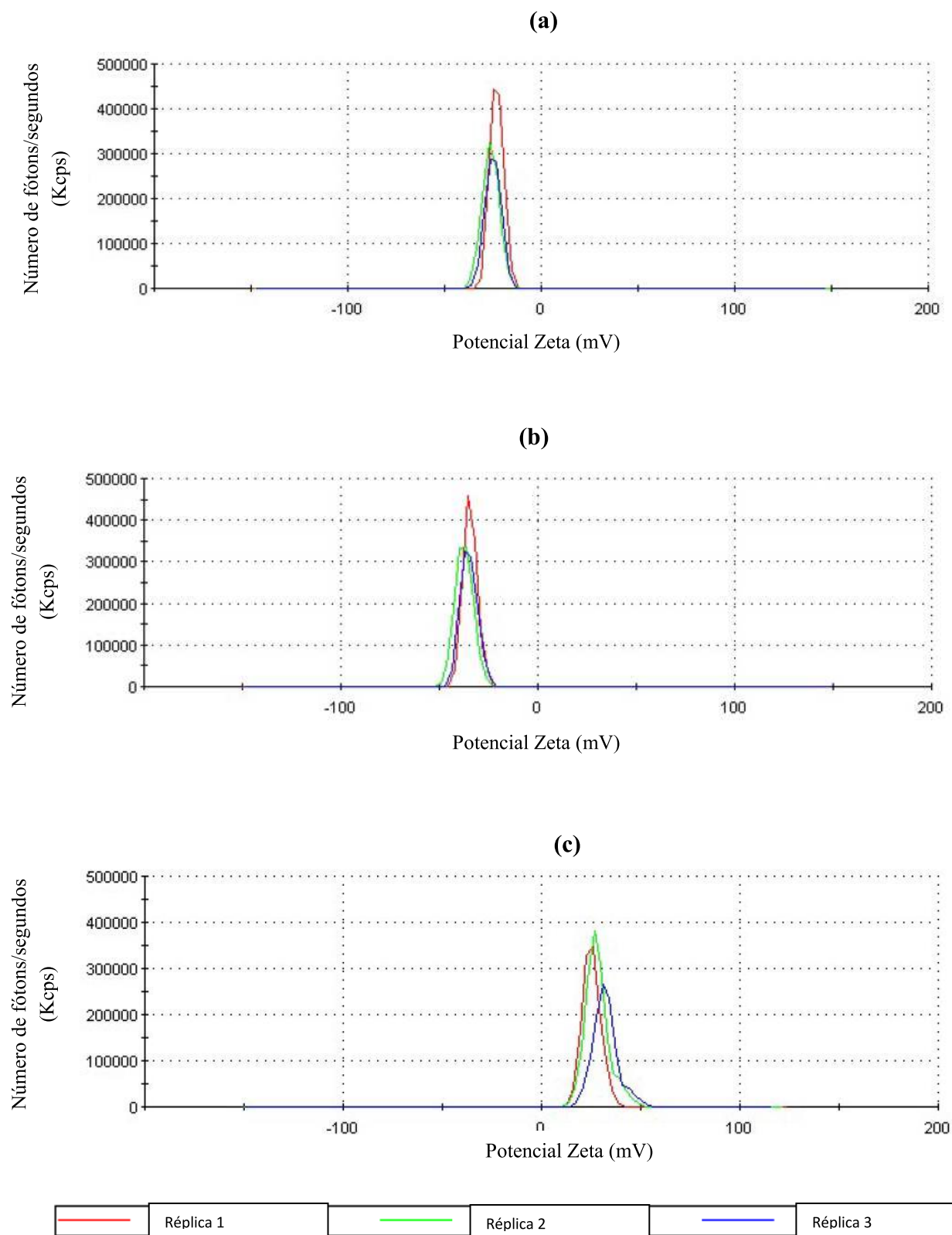
Por meio dos resultados descritos na Tabela 4, bem como nas Figuras 13a e 13b, pode-se constatar que as NC e as NC-OM apresentam potencial Zeta negativo, com valores iguais a

-32,7 ± 2,0 e -29,5 ± 1,3 mV, respectivamente. Esses valores são atribuídos à presença dos grupos carboxilatos (-COO-) na cadeia principal da poli (ϵ -caprolactona) (CALVO *et al.*, 1997; FLORES *et al.*, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) e apresentam-se similares aos obtidos em outros estudos (ANGELI, 2007; MARCO, 2009). Pode-se perceber, ainda, que a encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas nanocápsulas não alterou consideravelmente o valor do potencial de superfície comparado as nanocápsulas “brancas”. Deste modo, pode-se supor que os constituintes do óleo estejam, de fato, encapsulados no interior do núcleo oleoso e não adsorvidos à parede polimérica. Entretanto, outras análises são necessárias para confirmação dessa hipótese, tais como a avaliação da liberação *in vitro* do ativo encapsulado (considerando seu marcador químico), técnicas termoanalíticas e/ou espectroscópicas. Por fim, ressaltado-se que, em ambos os casos, existe o indicativo de estabilidade satisfatória para as formulações, já que os valores de potencial Zeta encontram-se próximos de -30 mV.

Em relação à formulação revestida, observou-se uma inversão do potencial Zeta para valores mais positivos (31,0 ± 1,8 mV) (Tabela 4 e Figura 13c), o que pode reforçar a ocorrência da adsorção da quitosana à superfície das partículas. De fato, a literatura aponta que a determinação do potencial Zeta é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a comprovação do revestimento de nanoestruturas (LEMARCHAND, GREF, COUVREUR, 2004; PYELL *et al.*, 2015). Diferentes estudos descrevem que tal revestimento é alcançado devido ao ancoramento do polímero catiônico à superfície das partículas, por meio do enredamento das cadeias poliméricas, resultando em uma estrutura do tipo *core-shell* (CALVO *et al.*, 1997; SEDEKY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2010). Adicionalmente, consideramos que o revestimento também possa ser devido às interações eletrostáticas entre as cargas negativas presentes na superfície do nanossistema e as cargas positivas da cadeia do polímero catiônico. Explicação semelhante foi proposta no estudo de Park e colaboradores (2015). Pelo exposto, a justificativa para a obtenção da carga de superfície positiva nas NC-OM-QT reside nas características da quitosana, a qual, depois de dissolvida em solução ácida, tem seus grupamentos amino protonados (MARINI, 2014). Nesse sentido, resultado similar ao encontrado em nosso trabalho foi obtido no estudo de Nagarwal (2011) quando da preparação de nanopartículas compostas por quitosana (30,0 ± 4 mV). Por fim, é importante mencionar que as partículas revestidas podem ser consideradas estáveis, já que o valor absoluto do potencial Zeta encontra-se acima de 30 mV.

Figura 13 – Gráfico de distribuição do potencial Zeta das nanocápsulas (n = 3).

a) NC; (b) NC-OM; (c) NC-OM-QT



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Em relação ao pH, a avaliação desse parâmetro é relevante na caracterização físico-química de nanoestruturas, pois alterações nos valores podem estar associadas à degradação do polímero ou de outros componentes da formulação (ANGELI, 2007). Além disso, é importante que o valor de pH das formulações apresente compatibilidade com a via de administração pretendida, visando minimizar a ocorrência de efeitos indesejáveis.

Analisando os resultados obtidos, é possível observar que as suspensões de nanocápsulas “brancas”, bem como aquelas contendo o óleo essencial de Melaleuca apresentaram valores de pH ligeiramente ácido ($6,11 \pm 0,50$ para as NC e $5,58 \pm 0,10$ para as NC-OM) (Tabela 4). Esses resultados são concordantes aos obtidos no estudo de Flores (2011) quando da preparação de nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) para a encapsulação do óleo essencial de Melaleuca e podem ser justificados com base no caráter ácido desse polímero devido à presença do grupo éster (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Por outro lado, as partículas revestidas (NC-OM-QT) apresentaram um valor de pH mais baixo ($5,06 \pm 0,17$) (Tabela 4), o que pode ser devido à presença dos grupamentos amino protonados na estrutura da quitosana. Em relação aos valores de pH obtidos, é importante considerar que os mesmos são adequados para o uso tópico dessas formulações, já que o pH da pele é ligeiramente ácido (4,6-5,8), o que reduz a possibilidade de irritação cutânea (LEONARDI, GASPAR, CAMPOS, 2002).

5.3.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

O óleo essencial de Melaleuca tem sido utilizado em diversas preparações farmacêuticas, incluindo às destinadas ao tratamento antiacneico, em concentrações de 5 a 10% (p/v) (GARCIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2009). Diante disso, priorizamos nas formulações desenvolvidas nesse trabalho, a encapsulação do referido óleo em uma menor concentração (2,5% p/v), uma vez que os pilares da aplicação da nanotecnologia na área farmacêutica pressupõem o direcionamento do ativo ao sítio alvo, bem como o controle de sua liberação e a minimização de possíveis degradações químicas ou enzimáticas permitindo, conseqüentemente, a redução da dose administrada.

Para a avaliação da EE do óleo essencial de *M. alternifolia* nas nanocápsulas foi empregada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas para a quantificação do Terpinen-4-ol, marcador químico desse óleo. Os resultados encontrados são descritos nos subitens a seguir.

5.3.2.1 Quantificação do Terpinen-4-ol no resíduo da rotavaporação

No método de precipitação do polímero pré-formado, o qual foi utilizado para o preparo das NC-OM, o solvente orgânico e parte da quantidade de água são retirados do sistema por meio do processo de rotavaporação. Nesse caso, a suspensão de nanocápsulas é submetida a aquecimento sob pressão reduzida e, dessa forma, haveria a possibilidade de perda dos constituintes voláteis presentes no óleo, especificamente o Terpinen-4-ol, marcador químico de escolha para a avaliação do processo de encapsulação e essencial para as atividades biológicas pretendidas. Assim, a quantificação desse marcador foi realizada no resíduo de rotavaporação por meio da técnica de CG-EM, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3.3.1. Os dados obtidos estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores* referentes a concentração do Terpinen-4-ol no resíduo de rotaevaporação

Amostra	A_{amostra}	A_{padrão}	C_{padrão}	C_{amostra}
1	29924137	46474871	0,14 mg/mL	0,45 mg/mL
2	34171224	46474871	0,14 mg/mL	0,51 mg/mL
3	30095786	46474871	0,14 mg/mL	0,45 mg/mL

Legenda: A_{amostra}: área do pico do Terpinen-4-ol na amostra; A_{padrão}: área do pico do Terpinen-4-ol no padrão; C_{padrão}: concentração do padrão de Terpinen-4-ol; C_{amostra}: concentração de Terpinen-4-ol na amostra.

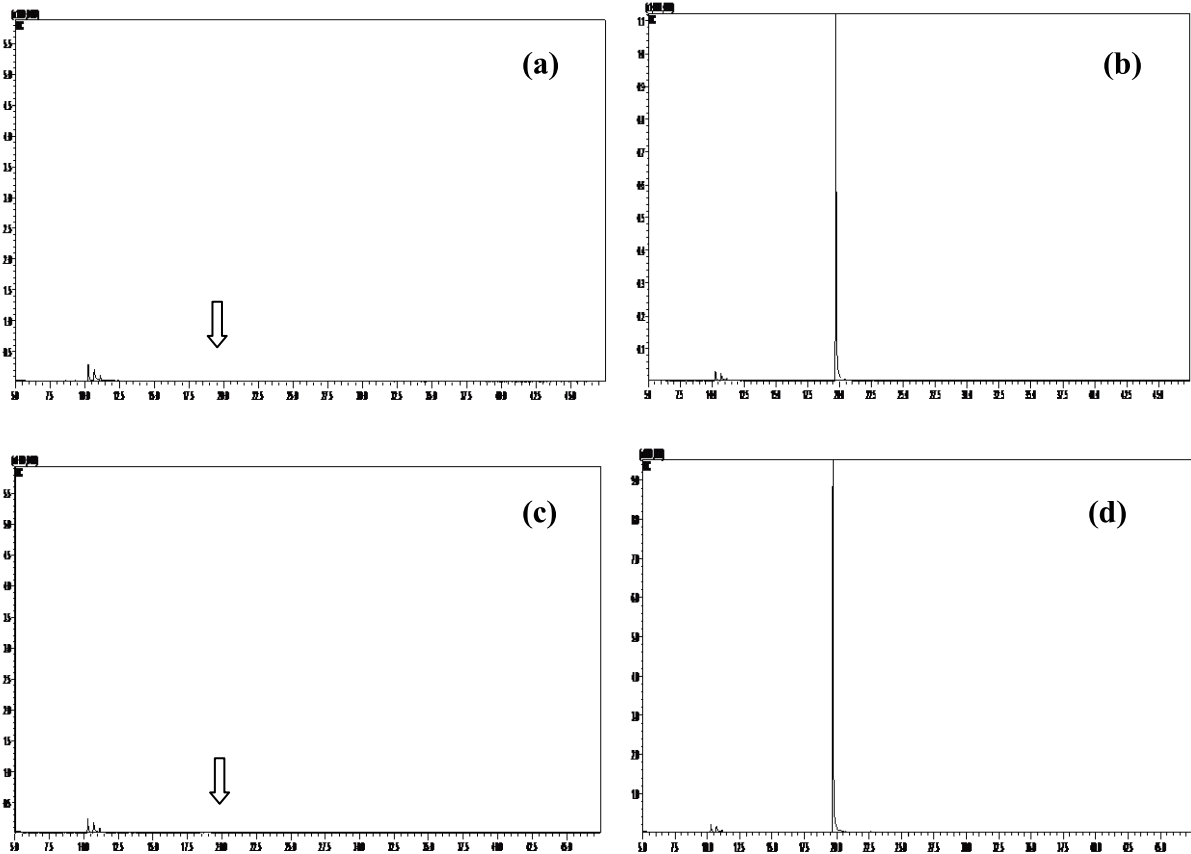
Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Por meio dos resultados apresentados, pode-se constatar uma pequena perda de Terpinen-4-ol durante o processo de rotavaporação, o que equivale a $0,47 \pm 0,03$ mg/mL ou aproximadamente 5,1% da quantidade total desse constituinte adicionado à formulação.

5.3.2.2 Quantificação do Terpinen-4-ol nas nanocápsulas

A partir da análise dos perfis cromatográficos dos ultrafiltrados (Figura 14a e 14c) referentes às amostras das NC-OM e NC-OM-QT por CG-EM, pode-se verificar a ausência do pico referente ao Terpinen-4-ol, quando em comparação aos cromatogramas obtidos no caso da adição do padrão de Terpinen-4-ol nessas amostras (14b e 14d).

Figura 14 – Perfil cromatográfico do ultrafiltrado referentes às NC-OM (a), NC-OM após adição do padrão de Terpinen-4-ol (b), NC-OM-QT (c) e NC-OM-QT após adição do padrão de Terpinen-4-ol (d)



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Deste modo, a fração não encapsulada do óleo essencial de *M. alternifolia*, estimada pela quantificação do Terpinen-4-ol, foi calculada levando-se em consideração apenas a quantidade desse marcador obtido no resíduo da rotavaporação. Portanto, a eficiência de encapsulação foi igual a $94,9 \pm 0,38\%$. Esse resultado pode sugerir que o método de deposição interfacial do polímero pré-formado foi eficiente para a incorporação do OM nas nanocápsulas e é similar ao encontrado no estudo de Flores (2011), no qual foi obtida EE igual a 96%. No trabalho citado, os autores desenvolveram, similarmente ao nosso estudo, nanocápsulas poliméricas para a encapsulação do OM por meio da técnica de nanoprecipitação e citam que a perda de Terpinen-4-ol possa ter acontecido, de fato, durante o processo de rotavaporação.

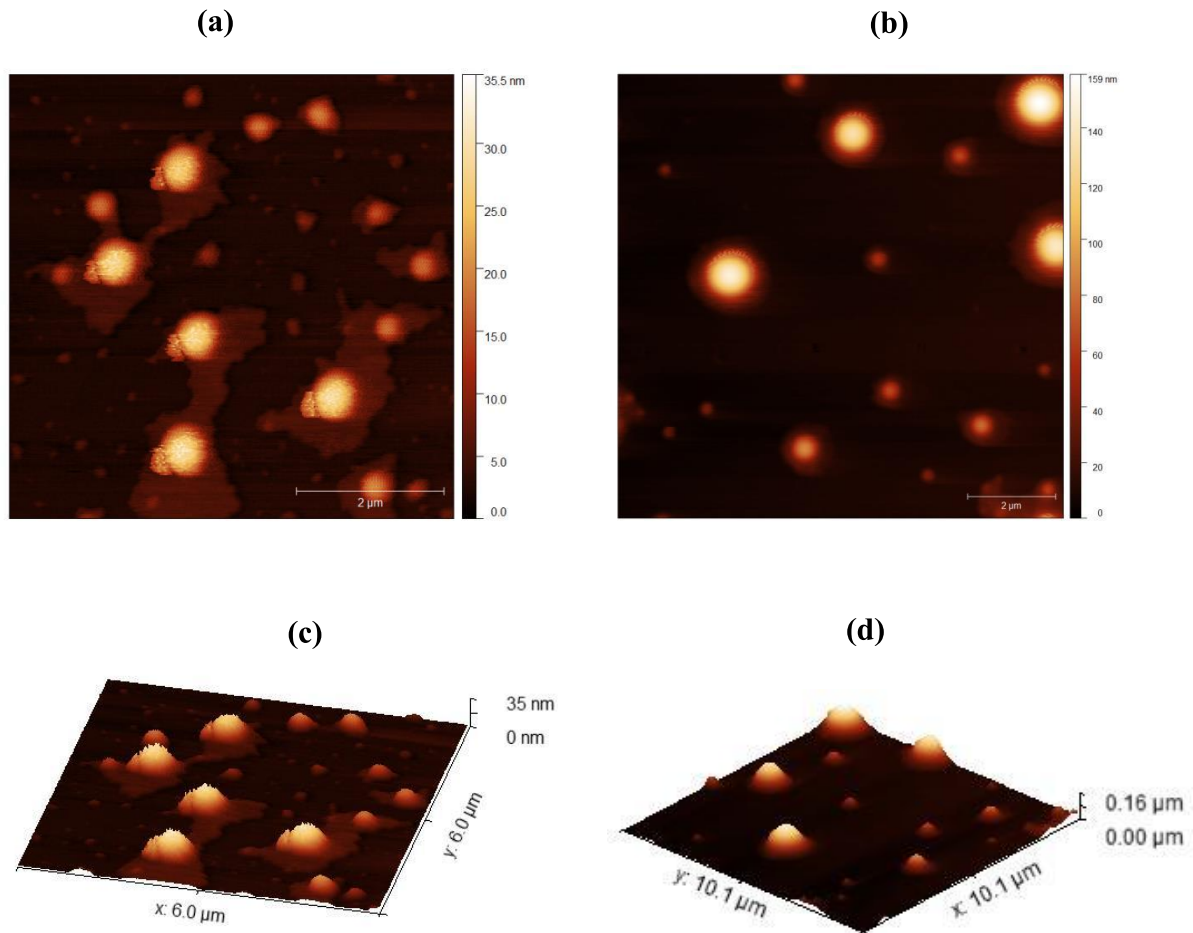
5.3.3 Avaliação morfológica

A avaliação morfológica das NC-OM e NC-OM-QT foi realizada por Microscopia de Força Atômica (MFA). Essa técnica fornece informações topográficas da amostra com alta resolução em três dimensões em escala nanométrica, sendo capaz de mostrar detalhes de superfície a nível atômico, possibilitando caracterizar simultaneamente o contorno das partículas, sua estrutura e organização entre estas (LARA 2008; LEITE, 2006).

As imagens mostram partículas esféricas com tamanho nanométrico e homogeneidade em relação ao formato, entretanto pode-se observar variação entre as diferentes nanocápsulas. Examinando as imagens relativas às NC-OM (Figuras 15a e 15c) notam-se sombras ao redor das nanopartículas, indicando que houve rompimento da estrutura e extravasamento do núcleo oleoso. Tal observação pode sugerir que as NC-OM apresentam um filme polimérico fino envolvendo o núcleo oleoso de característica maleável, e dessa forma, as partículas podem ter sofrido deformação devido ao processo de secagem ou mesmo pelo contato intermitente com a ponta do microscópio (LARA, 2008; LEITE *et al.*, 2005).

Diferentemente, as NC-OM-QT apresentaram morfologia altamente esférica e rodeadas por um *halo-like* (HAAS *et al.*, 2005) (Figuras 15b e 15d), sugerindo a presença de quitosana na superfície das partículas. Essa estrutura característica parece contribuir para a maior estabilidade das mesmas em relação à deformação devido ao processo de secagem ou pela interação com a ponta do equipamento. Ademais, por meio das imagens obtidas, tem-se mais um indício do revestimento das nanocápsulas contendo OM pelo polímero catiônico.

Figura 15 – Imagens de MFA das NC-OM (a) e das NC-OM-QT (b) vistas do topo (escala: 10x10 μm). Imagens de MFA em 3D das NC-OM (c) e das NC-OM-QT (d) (escala: 6x6 μm).

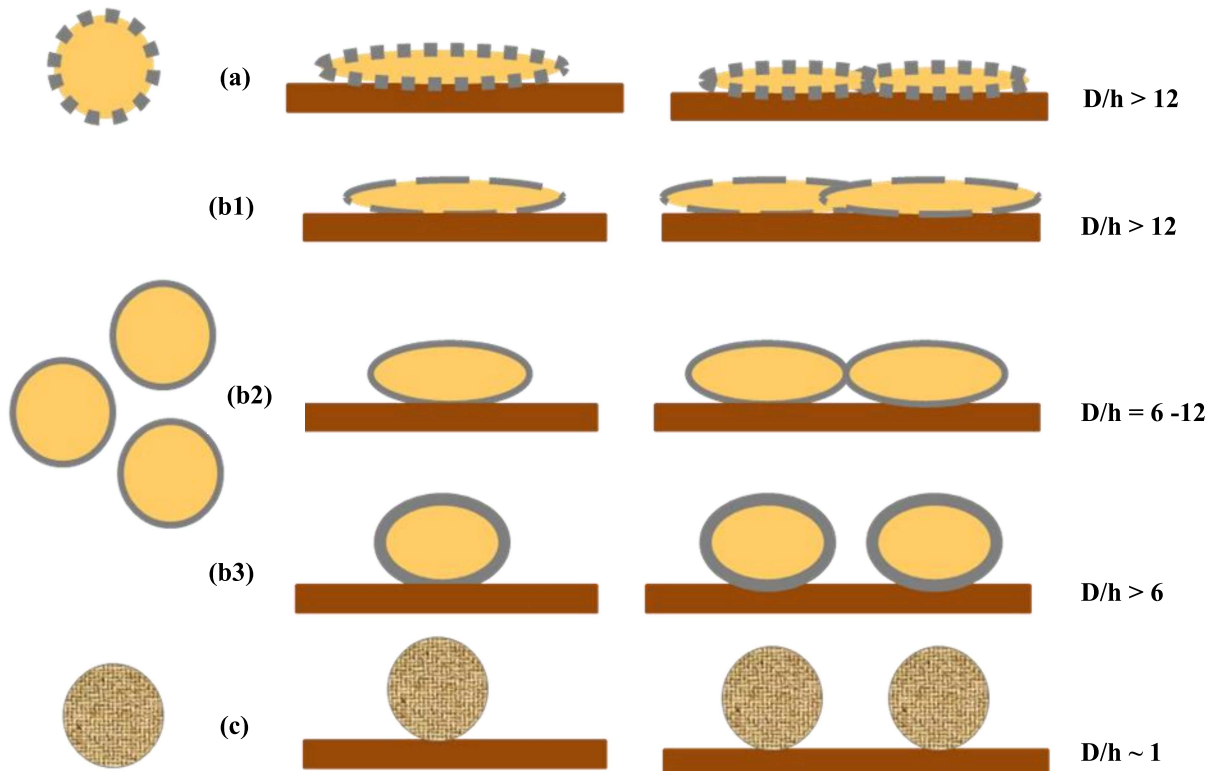


Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Como já descrito, a estrutura das nanocápsulas é maleável devido ao núcleo oleoso, sendo estas mais sujeitas às deformações (ARAÚJO, 2009; FIEL *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2005; LARA, 2008). Assim, com o intuito de confirmar o possível achatamento ocorrido durante a obtenção das imagens, calculou-se, com o auxílio do software do equipamento, a relação diâmetro/altura (D/h) das nanocápsulas em estudo ($n = 3$) (MONTASSER, FESSI, COLEMAN, 2002). De acordo com a literatura, o valor obtido para essa relação pode se alterar conforme a espessura da parede polimérica, a heterogeneidade da deposição do polímero sobre as nanopartículas durante o seu desenvolvimento (LEITE *et al.*, 2005), bem como em relação à associação do ativo às nanoestruturas (ARAÚJO, 2009). Nesse contexto, o

esquema a seguir representa os possíveis fenômenos de achatamento/deformação de nanoestruturas em relação aos valores de D/h (Figura 16).

Figura 16 - Esquema representativo dos possíveis fenômenos que contribuem para o achatamento das partículas durante a obtenção de imagens por MFA.



Legenda: (a) Representação de partículas de nanoemulsões, as quais não apresentam parede polimérica, depositadas sobre a superfície da mica tendem a se agregar. (b) Representação de nanocápsulas com espessuras diferentes de parede polimérica. (b1) parede polimérica descontínua; (b2) parede polimérica contínua com espessura fina; (b3) parede polimérica contínua com espessura grossa; Nas três situações representadas, as nanocápsulas se deformam, sendo em (b1) o efeito mais pronunciado, onde estas se comportem como nanoemulsões. Em (b2), as nanocápsulas tendem a se achatar mais que em (b3), devido à menor espessura da parede polimérica. (c) Representação de nanoesfera cuja estrutura é uma matriz polimérica, a qual confere maior rigidez, portanto ocorre ausência de deformação.

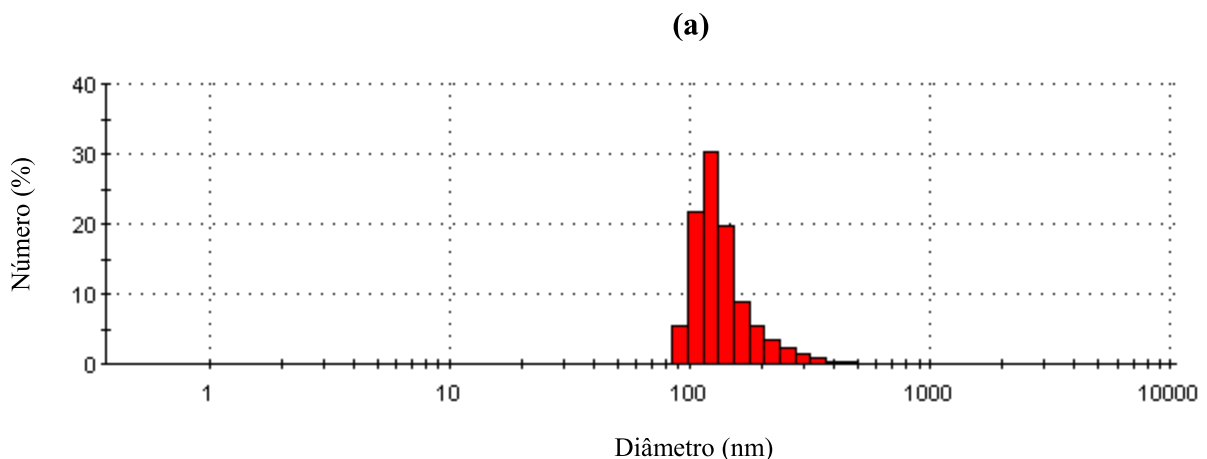
Fonte: ADAPTADO DE LEITE, 2006.

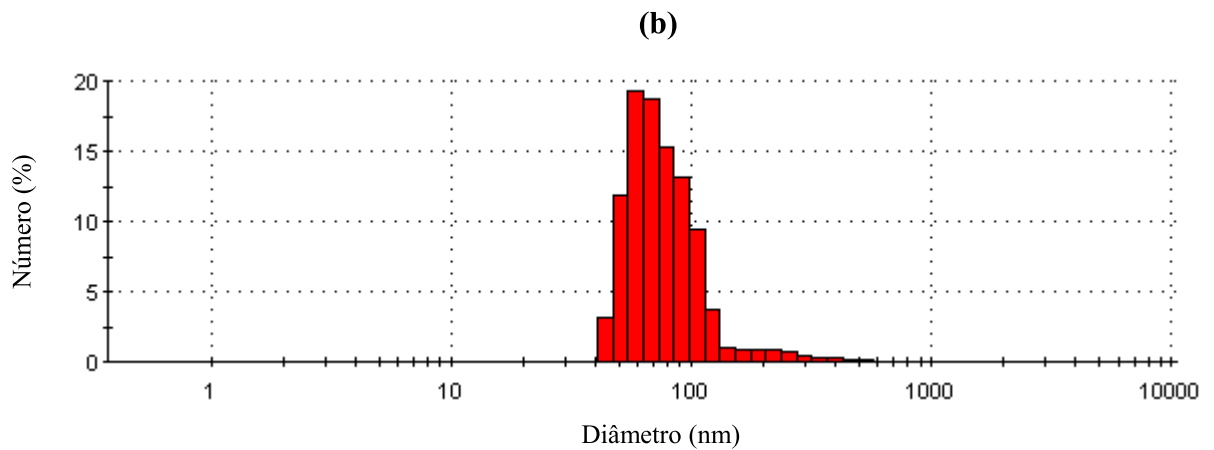
Para as NC-OM, a relação D/h foi igual a 20,8, apresentando comportamento típico de nanoemulsões, o que pode corroborar a presença de parede polimérica fina e ruptura da estrutura durante a aquisição das imagens. Por outro lado, para as NC-OM-QT essa relação foi de 7,7, o que explica o menor achatamento quando em comparação às NC-OM,

possivelmente devido ao revestimento com a quitosana que aumentou a espessura da parede polimérica provendo maior resistência a partícula.

Quanto ao diâmetro, as nanocápsulas apresentaram valores que variaram de 104 a 244 nm (NC-OM) e 123 a 241 nm (NC-OM-QT), diferentemente dos valores médios obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, especificamente $243,9 \pm 1,6$ nm para as NC-OM e $268,0 \pm 3,8$ nm para as NC-OM-QT (Tabela 4). Este fato pode ser atribuído à diferença entre as técnicas. Na MFA, as medições são realizadas diretamente nas imagens obtidas e as amostras são desidratadas, o que pode induzir a agregação ou ao achatamento das nanocápsulas após sua deposição sobre a superfície da mica, além da possibilidade da interação com a sonda ocasionar alterações nas mesmas. Ao passo que, na técnica espectroscópica, mede-se o raio hidrodinâmico das nanocápsulas em suspensão e, portanto, não há quaisquer alterações na amostra. Além disso, um número limitado de partículas foi medida pela técnica de microscopia, o que pode ter influenciado na distribuição de tamanho observado por essa técnica em comparação às análises no Zetasizer. No entanto, a partir da avaliação dos gráficos de distribuição de tamanho por número das NC-OM e das NC-OM-QT (Figuras 17a e 17b, respectivamente) obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, pode-se constatar faixas de distribuição compatíveis com os valores observados quando da determinação do diâmetro por MFA.

Figura 17 – Gráfico de distribuição de tamanho das nanocápsulas por número fornecida pelo Zetasizer. NC-OM (a) e NC-OM-QT (b)





Fonte: Elaborada pela autora (2019)

5.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*

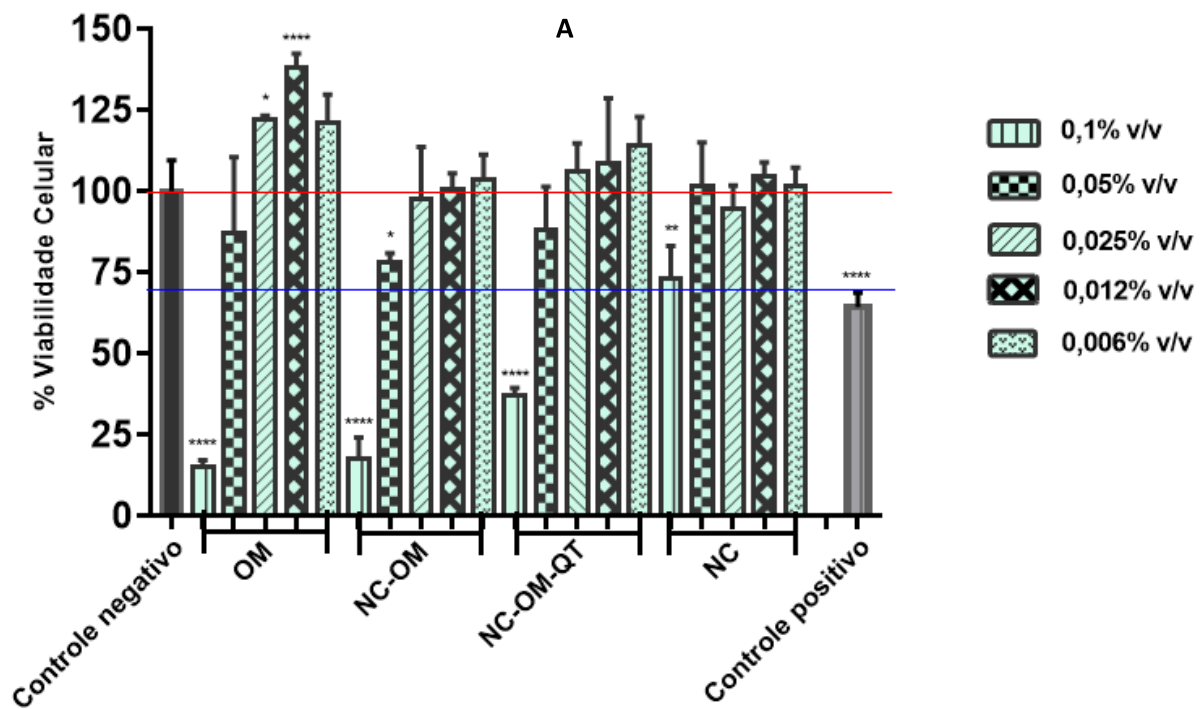
5.4.1 Avaliação da viabilidade celular

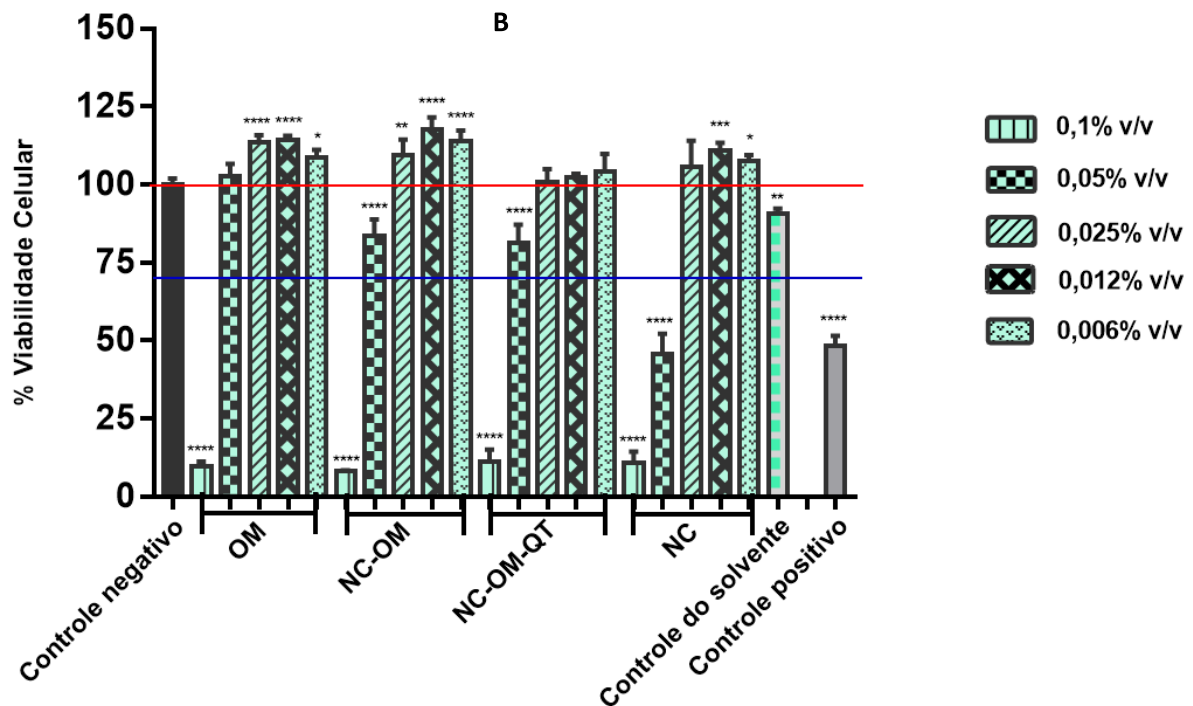
A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio da exposição de linhagem de fibroblastos (NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT) ao óleo essencial de *M. alternifolia*, bem como às diferentes formulações de nanocápsulas (NC, NC-OM e NC-OM-QT). Essas linhagens celulares foram escolhidas diante da intenção de utilização da formulação desenvolvida pela via tópica. As células foram cultivadas e tratadas com as amostras nas concentrações de 0,1 a 0,006% (v/v) em relação a quantidade de OM e a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o sal de tetrazólio (MTT) após 24 e 48 horas de tratamento. Como controles foram utilizados meio DMEM (controle negativo), meio DMEM acrescido do solvente [solução de polissorbato 80 a 0,5% (v/v)] e solução de DMSO a 5% (v/v) (controle positivo).

De acordo com os resultados dispostos na Figura 18, pode-se perceber, quando da incubação da linhagem de fibroblastos com o OM por 24h ou 48h, que a redução da viabilidade celular ocorreu de maneira significativa apenas na concentração inicial (0,1% v/v). Apesar de empregarem linhagem celular diferente, estudos publicados obtiveram resultados próximos aos encontrados em nosso trabalho após exposição (24-48h) de fibroblastos humanos ao óleo essencial de *M. alternifolia*. Nesses casos, concentrações de 300 µg/mL (SÖDERBERG *et al.*, 1996) e 1000 µg/mL (ASSMANN *et al.*, 2018; SÖDERBERG *et al.*, 1996) foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade das células. De acordo com SÖDERBERG e colaboradores (1996), tais resultados podem ser atribuídos às interações dos constituintes do óleo com as membranas celulares, de modo semelhante ao que ocorre em

relação à atividade antimicrobiana dessas substâncias. Nessa perspectiva, embora bem tolerado após aplicação tópica, estudos científicos apontam que possíveis efeitos tóxicos do OM são dose dependente e salientam que a ocorrência de irritação cutânea pode estar relacionada à utilização de concentrações elevadas desse óleo. Além disso, é relatado que reações alérgicas em indivíduos predispostos podem acontecer devido aos vários produtos de oxidação que podem ser formados quando da exposição do óleo à luz e ao ar (HAMMER *et al.*, 2006). Esse dado contribui para a justificativa de encapsulação do OM em sistemas nanoestruturados, o que possibilitaria a diminuição de possíveis efeitos tóxicos desse bioativo.

Figura 18 – Avaliação do OM, NC, NC-OM, NC-OM-QT sobre a viabilidade celular de linhagem celular de Fibroblasto NIH/3T3 após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento exposição.





*Diferença estatisticamente significativa da amostra em relação ao controle negativo (ANOVA/DUNNET, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Por outro lado, considerando o tempo de incubação de 24h, foi observado um incremento na porcentagem de viabilidade celular quando em comparação ao grupo controle para as concentrações de 0,025 e 0,012% (v/v). Esse resultado pode sugerir que, nessas concentrações, o óleo esteja induzindo a proliferação de fibroblastos, podendo estar relacionada com a suposta atividade cicatrizante do OM. Nesse contexto, tal propriedade já foi relatada em estudos anteriores (FLORES *et al.*, 2015). Além disso, resultado semelhante foi obtido no estudo de Assmann e colaboradores (2018) quando da exposição (72 h) de 300 $\mu\text{g/mL}$ do OM (contendo 34% de Terpinen-4-ol) em linhagem celular de fibroblasto humano HFF-1. Adicionalmente, esse mesmo comportamento foi observado em nosso estudo após 48h de incubação das células com concentrações de OM variando entre 0,025 a 0,006% (v/v). Essa observação pode corroborar a atividade indutora da proliferação de fibroblastos pelo OM.

Para as nanocápsulas “brancas” (NC), os resultados evidenciam que a viabilidade celular se equipara à obtida para o grupo controle negativo para as concentrações de 0,05 a 0,006% (v/v) no tempo de 24h e 0,025% (v/v) no tempo de 48h (Figura 18). Além disso, para

o tempo de 24h, a concentração de 0,1% (v/v) manteve a viabilidade celular acima de 70% o que, de acordo com a ISO 10993-5/2009, não caracteriza efeitos tóxicos significativos. Assim, os dados obtidos podem refletir em uma adequada tolerabilidade da linhagem NIH/3T3 às nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona), o que possivelmente contribui para a segurança da utilização desse carreador pela via tópica. Por outro lado, interessantemente, após 48h de incubação da linhagem de fibroblastos com concentrações de NC iguais a 0,012 e 0,006% (v/v), houve um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular comparativamente ao grupo controle negativo. Essa observação pode ser explicada a partir da capacidade de regeneração tecidual por parte dos triglicerídeos de cadeia média (FERREIRA *et al.*, 2012), os quais fazem parte do núcleo oleoso das partículas. É possível que tal efeito se mostre mais pronunciado após 48h, devido a um maior tempo requerido para a desestabilização das nanocápsulas e consequente exposição da totalidade do núcleo oleoso no meio de cultivo. De modo oposto, nota-se uma redução de viabilidade nos fibroblastos após sua incubação por 48h, com concentrações de NC iguais a 0,1 e 0,05%(v/v). Nesse caso, os valores de viabilidade celular encontram-se abaixo de 70%, indicando a possibilidade de aparecimento de efeitos tóxicos (ISO, 2009). Sob essa perspectiva, Trindade e colaboradores (2018) citam em seu trabalho que a citotoxicidade de nanocápsulas à base de PCL é incrementada com o aumento da dose e está associada, sobretudo, à interação do polímero hidrofóbico com a membrana das células.

No que diz respeito às NC-OM (Figura 18), os resultados evidenciam, após 24 h de incubação, porcentagem de viabilidade celular semelhante à obtida para o grupo controle negativo para as concentrações de 0,025 a 0,006% (v/v). Além disso, na concentração de 0,05% (v/v) a viabilidade celular encontra-se acima de 70%, situação na qual não há indícios de citotoxicidade (ISO, 2009). Comparando-se esses resultados com os obtidos, para as mesmas concentrações, no tempo de 48h, observa-se um incremento significativo da viabilidade celular na faixa de concentração compreendida entre 0,025 a 0,006% (v/v). Tal resultado pode ser explicado pela possível liberação de quantidade significativa do OM a partir das nanocápsulas após 48h de incubação, o que contribuiria para a indução da proliferação dos fibroblastos por parte dos constituintes do óleo. No entanto, ensaios de liberação *in vitro* devem ser conduzidos visando confirmar essa hipótese.

Confrontando os resultados obtidos para as NC-OM com aqueles encontrados para as NC, percebe-se um comportamento diferente em relação as concentrações 0,1 e 0,05% (v/v) após 24h de exposição. Nesse caso, pode indicar que a diminuição da viabilidade na NC-OM seja decorrente do OM, devido a maior viabilidade observada nas NC. No tempo de exposição

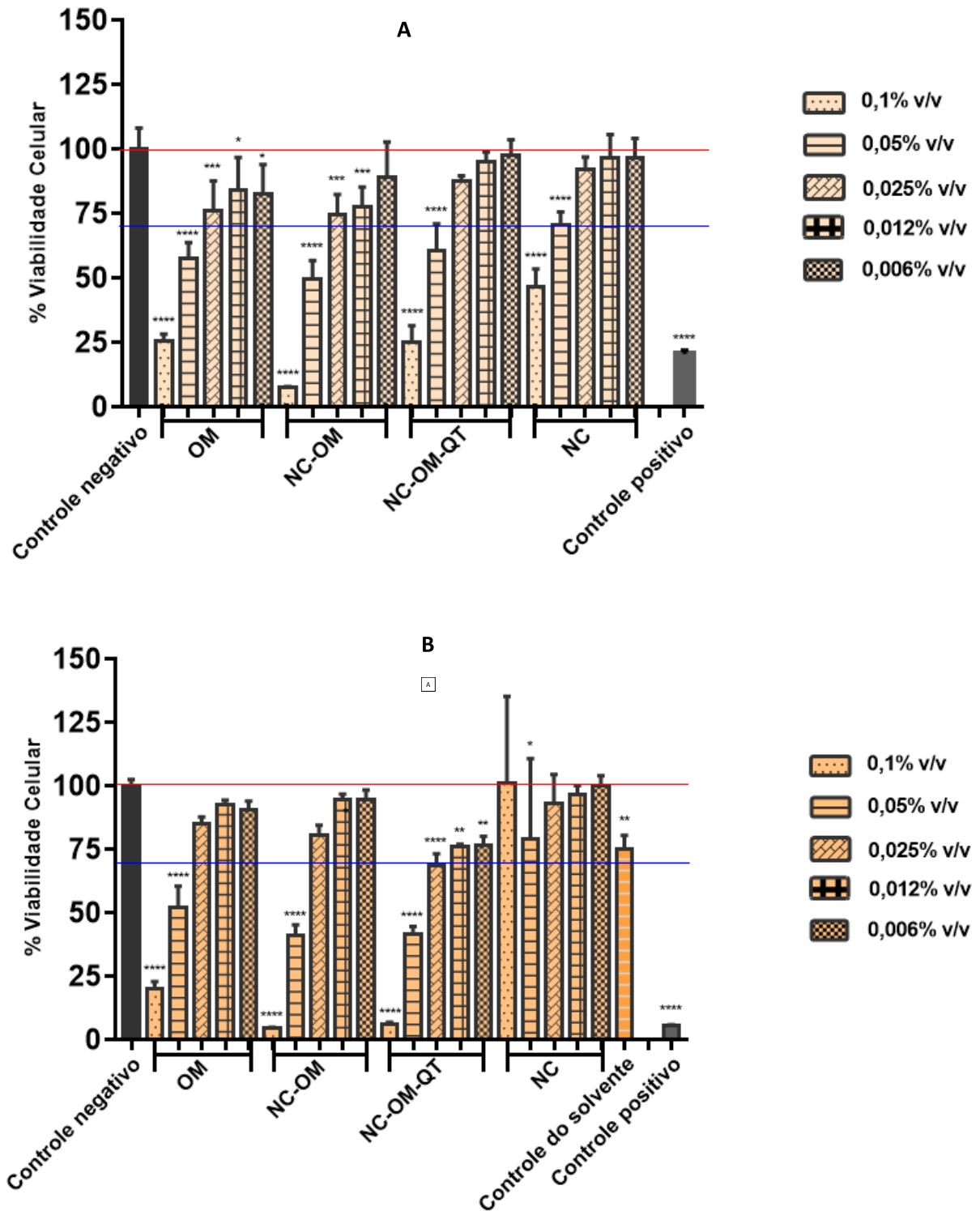
de 48h, ocorre uma inversão na concentração de 0,5% (v/v), sendo o NC-OM causando menor redução na viabilidade dos fibroblastos, podendo sugerir um controle na liberação do OM, o que levaria a uma menor exposição das células a grande concentração de OM em um mesmo momento.

Em relação as NC-OM-QT (Figura 18), as concentrações 0,025 a 0,006% (v/v) não diferiram significativamente do grupo controle negativo, salientando que, assim como as NC-OM, as nanopartículas revestidas não reduziram a viabilidade dos fibroblastos em relação ao óleo livre nos tempos de 24h e 48h. Além disso, no caso da concentração de 0,05% (v/v), a viabilidade celular encontra-se acima de 70% para ambos os tempos de incubação. Ainda, para a concentração de 0,1% (v/v) no tempo de 24h pode ser observado um ligeiro aumento de viabilidade quando comparado ao resultado obtido para as NC-OM e o OM. Nesse caso, sugerimos que a presença do revestimento reduziu a taxa de liberação do OM através da nanocápsula e também pode advir das às propriedades cicatrizantes da quitosana (PATRULEA *et al.*, 2015). Dessa forma, os resultados sugerem que o carreador desenvolvido pode ser promissor para a administração tópica.

No que se refere a viabilidade celular em queratinócitos (Figura 19), pode-se verificar que estes se mostraram mais sensíveis às amostras quando em comparação aos fibroblastos. Assim, quanto ao OM, houve redução de viabilidade em todas concentrações em 24h de tratamento comparado ao grupo controle negativo. No entanto, a partir da concentração de 0,025% (v/v) os valores de viabilidade se encontram acima de 70%. Sob essa perspectiva, resultados semelhantes foram obtidos em estudos publicados (LAN *et al.*, 2014; CASALLE, 2016). Já para o tempo de 48h, é possível perceber que as concentrações de 0,025 a 0,006% (v/v) não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo. Esse resultado pode indicar indução de proliferação dos queratinócitos a partir dos constituintes do OM liberados mais tardiamente ou uma concentração mais significativa para esse efeito sobre as células.

Por outro lado, as NC não diferiram do grupo controle negativo das concentrações 0,025 a 0,006% (v/v) no tempo de 24h e apresentaram uma ligeira redução da viabilidade apenas na concentração 0,05% (v/v) no tempo de 48h, demonstrando uma boa tolerabilidade das células à essa amostra. Nesse sentido, existe na literatura o relato do baixo potencial citotóxico de nanocápsulas à base de PCL em linhagem celular de queratinócitos (BRUINSMANN, 2016).

Figura 19 - Avaliação do OM, NC, NC-OM, NC-OM-QT sobre a viabilidade celular de linhagem celular de Queratinócito (HaCaT) após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento.



*Diferença estatisticamente significativa da amostra em relação ao controle negativo (ANOVA/DUNNET, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Para as NC-OM, em ambos os tempos de incubação e a partir da concentração de 0,025% (v/v), os valores de viabilidade celular encontram-se acima de 70%, o que não configura potencial citotóxico (ISO, 2009). Além disso, pode-se perceber que não houve diferença estatística significativa na concentração de 0,006% (v/v) comparado ao grupo controle negativo com 24h de exposição e nas concentrações 0,012 e 0,006% (v/v) com 48h de exposição. No caso específico da concentração de 0,012% (v/v), pode-se sugerir que, em 48h, devido à maior liberação do óleo a partir da formulação, houve a indução da proliferação das células impulsionada pelos constituintes do OM. Por fim, é relevante mencionar que, quando da comparação das NC-OM com o óleo livre, verifica-se que o carreador nanoestruturado não incrementa a citotoxicidade do OM, o que demonstra que a estratégia de nanoestruturação desse composto é potencialmente promissora.

Após 24h de incubação com a linhagem celular, as NC-OM-QT propiciaram viabilidade celular comparada à do grupo controle negativo para as concentrações de 0,025 a 0,006% (v/v). Esse dado é de extrema relevância, sobretudo quando consideramos que, na concentração de 0,025% (v/v), o OM e as NC-OM levam a uma diminuição significativa da viabilidade das células em relação ao grupo controle negativo. Dessa forma, é possível inferir que a formulação revestida é capaz de diminuir o potencial citotóxico do óleo essencial de *M. alternifolia*, o que reforça uma das premissas básicas da aplicação da nanotecnologia para a liberação de bioativos: a diminuição da toxicidade da substância encapsulada. Sugerimos que esse resultado possa ser devido às propriedades cicatrizantes da quitosana. No entanto, após 48 h de exposição, foi observado uma redução na viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Nesse caso, a elevada densidade de cargas decorrentes da protonação dos grupamentos amino da quitosana, pode, ao longo do tempo, interagir de maneira mais pronunciada com a membrana plasmática das células, levando ao aumento da permeabilidade celular com consequente perda da integridade da membrana. Essa mesma teoria foi relatada por Thakur e co-autores (2018) quando da avaliação da citotoxicidade de formulação nanoestruturada à base de quitosana frente à linhagem HaCaT (THAKUR *et al.*, 2018).

5.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Várias publicações relatam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* para inúmeras cepas de bacterianas (FLORES, 2011; TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013), incluindo *Propionibacterium acnes* (CARSON; HAMMER; RILEY,

2006; HAMMER, 2015; LEE *et al.*, 2013) recentemente renomeada como *Cutibacterium acnes*. Nesse contexto, é descrito que o grande potencial antimicrobiano desse óleo essencial se deve à dificuldade que os microrganismos encontram em modificar seu sistema enzimático visando estabelecer mecanismos de resistência ao mesmo. Esse fato é explicado pela composição química complexa do OM, o qual apresenta mais de 100 constituintes (JESUS, 2007). A esse respeito, cabe salientar que o Terpinen-4-ol é considerado o principal responsável pela atividade do óleo frente aos microrganismos. Partindo desse pressuposto, um dos objetivos desse trabalho diz respeito à nanoestruturação do óleo de Melaleuca em sistema inédito objetivando possibilitar o incremento de seu efeito antimicrobiana. Assim, nessa parte do trabalho, avaliamos a eficácia antimicrobiana do óleo livre e nanoestruturado frente à *C. acnes*. Sob essa perspectiva, a CIM, menor concentração do óleo (encapsulado ou não) capaz de inibir o crescimento visível microbiano, foi avaliada utilizando o método de macrodiluição em caldo e foi detectada visualmente com auxílio do corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio). O INT é um sal de monotetrazólico que apresenta capacidade de ser reduzido na presença de desidrogenases. Estas enzimas em células vivas transformam o reagente incolor de INT em INTF (cloreto de iodonitrotetrazólio formazan) de coloração vermelha (SILVA, 2018). A concentração das amostras variou entre 0,56 a 0,004% (v/v) e, especificamente para o antimicrobiano sintético, foi de 0,03 a 4 µg/mL. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (CIM) e efeito das amostras frente à *C. acnes*.

	OM	NC	NC-OM	NC-OM-QT	Clindamicina
CIM	0,56% v/v	---	0,56% v/v	0,14% v/v	0,5 µg/mL
EFEITO	Bactericida	---	Bactericida	Bactericida	Bactericida

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Primeiramente, observou-se que a CIM para a clindamicina, antimicrobiano amplamente utilizado no tratamento tópico da acne, foi compatível com o descrito na literatura (ZHU *et al.*, 2018) e demonstra a sensibilidade do microrganismo a esse fármaco. Além disso, o efeito bactericida é concordante com dados científicos (HAN *et al.*, 2018).

A CIM para o OM apresentou-se próximo ao reportado por Carson e colaboradores (2006) ao avaliarem o óleo frente à *C. acnes* obtida de isolados clínicos (CIM = 0,05-0,63% v/v). O óleo essencial de *M. alternifolia* possui cerca 100 constituintes, os quais podem variar em relação à origem do óleo utilizado. Isso pode explicar a variação de atividade biológica

entre os trabalhos da literatura. Lee *et al.* (2013) verificaram a atividade antibacteriana de alguns terpenos presentes no óleo essencial de *M. alternifolia* em *C. acnes* e relataram que o efeito mais pronunciado se deve ao Terpinen-4-ol. No entanto, o estudo demonstrou que outras substâncias presentes no óleo também possuem ação sobre o microrganismo, tais como α -terpineol, α -terpineno, limoneno, ρ -cimeno, α -pineno e 1,8-cineol. Estes constituintes estão presentes em concentrações significativas no OM avaliado nesse trabalho e, portanto, podem contribuir para a atividade antimicrobiana do óleo em estudo.

Adicionalmente, o óleo, na CIM estabelecida, apresentou efeito bactericida frente ao microrganismo, sendo esse efeito também observado para as formulações NC-OM e NC-OM-QT. Esse resultado é condizente com o estabelecido na literatura (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

As nanocápsulas brancas não apresentaram atividade frente ao microrganismo. Esse resultado era esperado, uma vez que não foram encontrados na literatura relatos de atividade antimicrobiana dos constituintes dessas partículas frente à *C. acnes*. Por outro lado, a encapsulação do OM nas nanocápsulas de PCL manteve o valor de CIM obtido para o óleo livre, sugerindo que a nanoestruturação não resultou na perda de atividade do OM. Isso demonstra que o método de preparo, bem como os constituintes das nanocápsulas não interferiram na atividade antimicrobiana do mesmo. Consideramos levantar essa discussão, uma vez que existem relatos de que a eficácia do OM pode sofrer interferência negativa de excipientes presentes em preparações farmacêuticas (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999). Ainda, é possível supor que, devido à liberação gradual do OM a partir do núcleo oleoso das nanocápsulas, não tenhamos conseguido observar um incremento da atividade do mesmo frente ao microrganismo. No entanto, essa teoria deve ser comprovada a partir de ensaios de liberação *in vitro*.

Diferentemente, as NC-OM-QT propiciaram maior atividade antimicrobiana frente ao microrganismo testado, com redução de 4x no valor da CIM para o óleo livre. A partir desse dado, pode-se constatar que o revestimento com quitosana melhorou a atividade do OM. Como já descrito, a quitosana apresenta atividade antimicrobiana devido à grupos amino protonados que permitem o estabelecimento de interações desse polímero com membranas celulares. A capacidade de interagir eletrostaticamente com sítios aniônicos presentes na parede celular de microrganismo, como os ácidos teicoicos e lipoteicoicos presentes em bactérias Gram positivas, impedem a entrada de nutrientes ou, ainda, contribui para a perda da integridade da membrana plasmática do microrganismo, ocasionando distúrbios no metabolismo, inibição do crescimento e até mesmo a morte da bactéria (CARONI, 2009;

VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Adicionalmente, o diâmetro reduzido das estruturas pode favorecer a deposição de um maior número de partículas na superfície da membrana do microrganismo, contribuindo para a penetração de maiores quantidades da substância ativa (FLORES *et al.*, 2013). Sob outra perspectiva, é importante mencionar que, na forma nanoestruturada, a quitosana apresenta maior relação superfície/volume, o que implica em maior densidade de carga superficial, possibilitando o incremento da afinidade pela superfície celular dos microrganismos e, conseqüentemente, maior atividade biológica (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Ademais, a atividade bactericida observada é condizente ao efeito da quitosana frente a essa bactéria (FRADE, 2018; KIM *et al.*, 2017).

Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que as nanocápsulas revestidas por quitosana constituem ferramenta promissora para a veiculação do OM visando o tratamento tópico da acne vulgar. Nesse sentido, é importante destacar que os protocolos atuais para o tratamento dessa patologia preconizam a utilização da associação de ativos em detrimento à monoterapia, objetivando minimizar a ocorrência de resistência microbiana. Assim, a associação entre o OM e a quitosana pode contribuir para uma maior eficácia terapêutica, bem como para contornar o inconveniente da resistência.

6. CONCLUSÃO

- O óleo essencial de *M. alternifolia* foi caracterizado quali-quantitativamente por CG-EM, sendo confirmada a presença do quimiotipo Terpinen-4-ol, bem como dos demais constituintes, em conformidade com os padrões de qualidade descrito na ISO 4730/2017;
- As nanocápsulas foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e exibiram parâmetro físico-químicos adequados e compatíveis com outros estudos científicos, com diâmetro médio entre 200 e 300nm, pZ negativo, IP < 0,3, pH ligeiramente ácido (5-6), morfologia esférica e eficiência de encapsulação de aproximadamente 95% (considerando a concentração do marcador químico principal, Terpinen-4-ol);
- O revestimento das nanocápsulas com a quitosana foi confirmado pela variação no diâmetro médio, inversão no valor do pZ e morfologia das partículas quando em comparação às nanopartículas não revestidas;
- O ensaio de viabilidade mostrou boa tolerabilidade das linhagens celulares testadas frente às nanocápsulas desenvolvidas e sugere que a nanoestruturação pode ser capaz de reduzir possíveis efeitos citotóxicos do óleo livre;
- A avaliação da eficácia antimicrobiana indica que as nanocápsulas revestidas com quitosana são capazes de incrementar a atividade do óleo encapsulado.

Diante disso, consideramos que o carreador desenvolvido possa ser promissor para futuras aplicações no tratamento tópico da acne vulgar. No entanto, ensaios adicionais deverão ser realizados a fim de avaliar outros parâmetros relativos à formulação nanoestruturada. Dentre esses, sugere-se a investigação do perfil de liberação *in vitro* do óleo a partir das nanocápsulas, sua permeação cutânea em ensaios *ex vivo*, a avaliação do potencial anti-inflamatório do óleo nanoestruturado, bem como a estabilidade da formulação sob diferentes condições de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Aluured Publishing Corporation, 2007.

AGÊNCIA CNI DE NOTÍCIAS. Confederação Nacional da Indústria. MCTIC avança na elaboração de marco regulatório para a nanotecnologia no Brasil. Disponível em: <https://noticias.portaldaindustria.com.br/noticias/inovacao-e-tecnologia/mctic-avanca-na-elaboracao-de-marco-regulatorio-para-nanotecnologia-no-brasil/>. Acesso em 30 de jul 2018.

AGÊNCIA CNI DE NOTÍCIAS. Confederação Nacional da Indústria. 73% das empresas tem interesse em plicar nanotecnologia em seus processos. Disponível em: <https://noticias.portaldaindustria.com.br/noticias/competitividade/73-das-empresas-tem-interesse-em-aplicar-nanotecnologia-em-seus-processos/>. Acesso em 09 de jun. 2019.

ALBOUCHI, F.; SIFAOU, I.; REYES-BATLLE, M.; LÓPEZ-ARENCEBIA, A.; PIÑERO, J.E.; LORENZO-MORALES, J.; ABDERRABBA, M. Chemical composition and anti-Acanthamoeba activity of *Melaleuca styphelioides* essential oil. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 104-108, 2017.

AMRI, I.; MANCINI, E.; MARTINO, L.de; MARANDINO, A.; LAMIA, H.; MOHSEN, H.; BASSEM, J.; SCOGNAMIGLIO, M.; REVERCHON, E.; FEO, V.de. Chemical composition and biological activities of the essential oils from three *Melaleuca* species grown in Tunisia. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 16580-16591, 2012.

ANDRIESSEN. A.; LYNDE, C.W. Antibiotic resistance: shifting the paradigm in topical acne treatment. **J. Drugs Dermatol.**, v. 13, n. 11, p. 1358-1364, 2014.

ANGELI, V.W. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. 110f. Tese (Doutora em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

ARAÚJO, R.S. **Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário**. 131f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2009.

ASSIS, L.M.de; ZAVAREZE, E.daR.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L.A.de. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of food technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.

ASSMANN, C.E.; CADONÁ, F.C.; BONADIMAN, B.daS.R.; DORNELLES, E.B.; TREVISAN, G.; CRUZ, I.B.M.da. Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1253-1261, 2018.

ASSUNÇÃO, S.L. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas ricas em β -caroteno obtidas pela técnica de deslocamento de solvente**. 108f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2016.

AUBIN, G.G.; PORTILLO, M.E.; TRAMPUZ, A.; CORVEC, S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 6, p. 241–250, mar. 2014.

AZIMI, B.; NOURPANAH, P.; RABIEE, M.; ARBAB, S. Poly (ϵ -caprolactone) fiber: An overview. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 9, n. 3, p. 74-90, jan. 2014.

BADRI, W.; MILADI, K.; ROBIN, S.; VIENNET, C. NAZARI, Q.A.; AGUSTI, G.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polycaprolactone based nanoparticles loaded with indomethacin for anti-inflammatory therapy: from preparation to *ex vivo* study. **Pharm. Res.**, v. 34, n. 9, p. 1773–1783, 2017.

BAGATIN, E.; COSTA, C.S. Evidências sobre o tratamento da acne. **Diagn Tratamento**, v. 18, n. 1, p. 10-14, 2013.

BAGATIN, E.; TIMPANO, D.L.; GUADANHIM, L.R.S.; NOGUEIRA, V.M.A.; TERZIAN, L.R.; STEINER, D.; FLOREZ, M. Prevalência e formas clínicas da acne vulgar em adolescentes da cidade de São Paulo, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 3, p. 428-435, 2014.

BALEST, A.P. **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília. Ceilândia, 2013.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Degradação acelerada de suportes de poli(ϵ -caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 141-148, 2006.

BARBOSA, P.deP.M. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos silvestres de distintos biomas do estado de São Paulo para produção de compostos antimicrobianos**. 138f. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2014.

BERGMANN, B.R. A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. **Cienc. Cult.**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

BERTHELOT, P.; CARRICAJÓ, A.; AUBERT, G.; AKHAVAN, H.; GAZIELLY, D.; LUCHT, F. Outbreak of postoperative shoulder arthritis due to *Propionibacterium acnes* infection in nondebilitated patients. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 27, n. 9, p. 987–990, 2006.

BHATE, K.; WILLIAMS, H.C. Epidemiology of acne vulgaris. **British Association of Dermatologists**, v. 168, n. 3, p. 474-485, mar. 2013

BIJU, S.S.; AHUJA, A.; KHAR, R.K.; CHAUDHRY, R. Formulation and evaluation of an effective pH balanced topical antimicrobial product containing tea tree oil. **Pharmazie**, v. 60, n. 3, p. 208-211, 2005.

BRAND, C.; FERRANTE, A.; PRAGER, R.H.; RILEY, T.V.; CARSON, C.F.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. **Inflamm Res.**, v. 50, n. 4, p. 213-219, 2001.

BRAND, C.; GRIMBALDESTON, M.A.; GAMBLE, J.R.; DREW, J.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. **Inflamm Res.**, v. 51, n. 5, p. 236-244, 2002.

BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflamm Res.**, v. 51, n. 6, p. 286-289, 2002.

BRASIL. Governo do Brasil, 2012. **Investimento em nanotecnologia pode chegar à R\$ 110 milhões**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/educacao-e-ciencia/2012/11/investimento-em-nanotecnologia-pode-chegar-a-r-110-milhoes>. Acesso em 30 de jul. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 1.358, de 20 de agosto de 2014**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Ministério da Saúde, Brasília, 2014. Disponível em: < <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=44&data=21/08/2014>>. Acesso em 17 de ago 2017.

BRENNER, F.M.; ROSAS, F.M.B.; GADENS, G.A.; SULZBACH, M.L.; CARVALHO, V.G.; TAMASHIRO, V. Acne: um tratamento para cada paciente. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 15, n. 3, p. 257-266, mai./jun., 2006.

BROPHY, J.J.; DAVIES, N.W.; SOUTHWELL, I.A.; WILLIAMS, L.R. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **J. Agric. Food Chem.**, n. 37, n. 5, p. 1330-1335, 1989.

BRUINSMANN, F.A. **Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib e avaliação do efeito antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão**. 88f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.

BULCÃO, R.P. **Avaliação toxicológica *in vivo* de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis**. 159f. Tese (Doutora em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

CALABRESE, A.P.M. **Estudos da inativação de *Propionibacterium acnes* por fotodinamização de hipericina**. 61f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.

CALDERINI, A. **Preparação e caracterização de nano-esferas de PLGA contendo 5-fluorouracil e estudo do acoplamento de quitosana e ácido fólico em sua superfície.** 208f. Tese (Doutora em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

CALVO, P.; REMUNÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocápsulas and submicron-emulsions. **Colloid Polym. Sci.**, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997.

CAMPOS, M.; PENNA, G. **Perfil de atendimento de doenças de pele pelos dermatologistas da SBD nas regiões do Brasil.** 2007. Disponível em: <http://www5.ensp.fiocruz.br/biblioteca/home/exibedetalhesBiblioteca.cfm?ID=4685>. Acesso em 27 de ago. 2017.

CARSON, C.F.; COOKSON, B.D.; FARRELLY, H.D.; RILEY, T.V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 421-424, mar. 1995.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, jan. 2006.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, p. 49-55, feb. 1993.

CASALLE, N. **Susceptibilidade de carcinoma espinocelular oral ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e suas principais porções solúveis.** Dissertação (Mestre em Ciências Odontológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2016.

CASTRO, C.de; SILVA, M.L.da; PINHEIRO, A.L.; JACOVINE, L.A.G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **R. Árvore**, v.29, n.2, p.241-249, nov. 2005.

CASTRO, G.A.; OLIVEIRA, C.A.; MAHECHA, G.A.; FERREIRA, L.A. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 303, n. 7, p. 513-520, 2011.

CAZO, N.A.; PEREIRA-FILHO, E.R.; SILVA, M.F.G.F.da; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PUHL, A.C.; POLIKARPOV, I.; FORIM, M.R. Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital Elec. J. Chem.**, v, 4, n. 2, p. 54-76, 2012.

CÉ, R. **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com quitosana para potenciais aplicações farmacêuticas.** 122f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.

CHUNG, Y.C.; SU, Y.P.; CHEN, C.C.; JIA, G.; WANG, H.L.; WU, J.C.G.; LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 25, n. 7, p. 932-936, jul. 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.** 6th ed. CLSI document M11-A6, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 28th ed. CLSI supplement M100-S28, 2018.

COENYE, T.; HONRAET, K.; ROSSEL, B.; NELIS, H.J. Biofilms in skin infections: *Propionibacterium acnes* and acne vulgaris. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 156-159, sep. 2008.

COSTA, A.; ALCHORNE, M.M.deA.; GOLDSCHMIDT, M.C.B. Fatores etiopatogênicos da acne vulgar. **An Bras Dermatol.**, v. 83, n. 5, p. 451-459, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CUNHA, T.F.da. **Aplicação do poli(ε-caprolactona) com estrutura estrelada para obtenção de microesferas biorreabsorvíveis.** 91f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

DAS, S.; REYNOLDS, R.V. Recent advances in acne pathogenesis: implications for therapy. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 15, n. 6, p. 479-488, dec. 2014.

DEL ROSSO, J.Q. Oral doxycycline in the management of acne vulgaris: current perspectives on clinical use and recent findings with a new double-scored small tablet formulation. **J. Clin. Aesthet. Dermatol.**, v. 8, n. 5, p. 19-26, 2015.

DELAHAYE, F.; FOL, S.; CELARD, M.; VANDENESCH, F.; BEAUNE, J.; BOZIO, A.; GEVIGNEY, G.de. *Propionibacterium acnes* infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature. **Arch. Mal. Coeur. Vaiss.**, v. 98, n. 12, p. 1212–1218, 2005.

DEMINA, O.M.; KARTELISHEV, A.V.; KARPOVA, E.I.; DANISCHUK, O.I. Role of cytokines in the pathogenesis of acne. **International Journal of Biomedicine**, v. 7, n. 1, p. 37-40, mar. 2017.

DIMER, F.A.; FRIEDRICH, R.B.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DRENO, B.; GOLLNICK, H.P.M.; KANG, S.; THIBOUTOT, D.; BETTOLI, V.; TORRES, V.; LEYDEN, J. Understanding innate immunity and inflammation in acne: Implications for management. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 29, Suppl. 4, p. 3–11, jun. 2015.

EADY, E.A.; GLOOR, M.; LEYDEN, J.J. *Propionibacterium acnes* resistance: a worldwide problem. **Dermatology**, v. 206, n. 1, 54-56, 2003.

ENSHAIEH, S.; JOOYA, A.; SIADAT, A.H.; IRAJI, F. The efficacy of 5% topical tea tree oil gel in mild to moderate acne vulgaris: a randomized, double-blind placebo-controlled study. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 73, n. 1, p. 22–25, 2007.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FERNANDES, L.L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de quitosana para aplicações biomédicas.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

FERREIRA, A.M.; SOUZA, B.M.V.de; RIGOTTI, M.A.; LOUREIRO, M.R.D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 46, n. 3, p. 752-760, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation de systems colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent Application** 0274961A1, 20 july, 1988.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FEUILLOLAY, C.; PECASTAINGS, S.; LE GAC, C.; FIORINI-PUYBARET, C.; LUC, J.; JOULIA, P.; ROQUES, C. A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. **Phytomedicine**, v. 23, n. 3, p. 307–315, mar. 2016.

FIEL, L.A.; REBELO, L.M.; SANTIAGO, T.deM.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; SOUSA, J.S.de; POHLMANN, A.R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsulas. **Soft Matter**, v. 7, p. 7240–7247, 2011.

FIGUEIREDO, A.; MASSA, A.; PICOTO, A.; SOARES, A.P.; BASTO, A.S.; LOPES, C.; RESENDE, C.; REBELO, C.; BRANDÃO, F.M.; PINTO, G.M.; OLIVEIRA, H.S.de; SELORES, M.; GONÇALO, M.; BELLO, R.T. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte I: Epidemiologia, etiopatogenia, clínica, classificação, impacto psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 27, n. 1, p. 59-65, jan. 2011.

FLORES, F.C. **Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: Desenvolvimento de formulações e atividade biológica**. 114f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2011.

FLORES, F.C.; LIMA, J.A.de; RIBEIRO, R.F.; ALVES, S.H.; ROLIM, C.M.; BECK, R.C.; SILVA, C.de.B.da. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281-286, 2013.

FLORES, F.C.; LIMA, J.A.de; SILVA, C.R.da; BENVEGNÚ, D.; FERREIRA, J.; BURGER, M.E.; BECK, R.C.R.; ROLIM, C.M.B.; ROCHA, M.I.U.M.; VEIGA, M.L.da; SILVA, C.deB.da. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide antiedematogenic effect and improved skin wound healing. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 800-809, 2015.

FLORES F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F.; ROLIM, C.M.B.; SILVA, C.deB.da; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quim. Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FRADE, M.L. **Hidrogéis como sistema de liberação de fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes***. Dissertação (Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2018.

FRIEDMAN; A.J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D.; CHAMPER, J.; QIN, M.; PIROUZ, A.; BLECHER, K.; OREN, A.; LIU, P.; MODLIN, R.L.; KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 5, p. 1231-1239, may. 2013.

GAMBLE, R. DUNN, J.; DAWSON, A.; PETERSEN, B.; McLAUGHLIN, L.; SMALL, A.; KINDLE, S.; DELLAVALLE, R.P. Topical antimicrobial treatment of acne vulgaris: An evidence-based review. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 13, n. 3, p. 141-152, jun. 2012.

GARCIA, C.C.; GERMANO, C.; OSTI, N.M.; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 3, p. 236-240, jul. 2009.

GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Lett Appl Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 806-808, dec. 2009.

GE, Y.; GE, M. Development of tea tree oil-loaded liposomal formulation using response surface methodology. **J. Liposome Res.**, v. 23, p. 1-10, 2015.

GRAZIANO, T.S.; CALIL, C.M.; SARTORATTO, A.; FRANCO, G.C.N.; GROPPA, F.C.; COGO-MÜLLER, K. *In vitro* effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatile sulphur compounds by oral bacteria. **J Appl Oral Sci.**, v. 24, n. 6, p. 582-589, nov./dec. 2016.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.daS.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol.**, v. 26, n. 3, p. 194-198, 1998.

GUTERRES, S.S.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; RAFFIN, R.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery. In: FANUN, M. Colloids in Drug Delivery. 1 e.d. Boca Raton: CRC Press, 2016. Volume 150, capítulo 3, p. 71-98.

HAAS, J.; KUMAR, M.N.V.R.; BORCHARD, G.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.M. Preparation and characterization of chitosan and trimethyl-chitosanmodified poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as DNA carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 1, p. E22-E30, 2005.

HADAŚ, E.; DERDA, M.; CHOLEWIŃSKI, M. Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of *Acanthamoeba* infection. **Parasitol. Res.**, v. 116, n. 3, p. 997-1001, aug. 2017.

HAMMER, K.A. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: a review of efficacy, tolerability and potential modes of action. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 45, n. 2, p. 106-110, 2015.

HAMMER, K.A.; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E.M.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, n. 6, p. 389-392, dec. 2003.

HÄRTER, A.P.G. **Desenvolvimento de nanoemulsões e nanopartículas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis**. 127f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

HÄRTER, A.P.G. MOTTA, M.H.; BARROS, J.G.de; RIBEIRO, R.F.; ADAMS, A.I.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; SILVA, C.deB.da. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. **Quim. Nova**, v. 37, n. 6, p. 996-999, 2014.

HÜBSCHMANN, H-J. Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications. 2ª ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.: Weinheim, 2009.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3ª ed., ISO, 2009.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 4730:2017 – Essencial oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (Tea tree oil). 3ª ed. ISO, 2017.

JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 90f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Pós-Graduação de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

- JESUS, E.R.de; ELLENZOHN, R.M.; BARIN, C.S. Essential oil from *Melaleuca Alternifolia*: optimization of analytical method. **UNOPAR Cient., Ciênc. Exatas. Tecnol.**, v. 6, p. 67-72, 2007.
- JESUS, S.; SOARES, E.; BORCHARD, G.; BORGES, O. Poly- ϵ -caprolactone/chitosan nanoparticles provide strong adjuvant effect for hepatitis B antigen. **Nanomedicine**, v. 12, n. 19, p. 2335-2348, 2017.
- JUERGENS, U.R.; ENGELEN, T.; RACKÉ, K.; STÖBER, M.; GILLISSEN, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, p. 281–287, 2004.
- KESZEI, A. HASSAN, Y.; FOLEY, W.J. A biochemical interpretation of terpene chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. **J. Chem. Ecol.**, v. 36, n. 6, p. 652-661, 2010.
- KIM, B.; SHIN, S. Antimicrobial and improvement effects of tea tree and lavender oils on acne lesions. **J. Convergence Inf. Technol.**, v. 8, n. 13, p. 339–345, 2013.
- KIM, J.H.; YU, D.; EOM, S.H.; KIM, S.H.; OH, J.; JUNG, W.K.; KIM, Y.M. Synergistic antibacterial effects of chitosan-caffeic acid conjugate against antibiotic-resistant acne-related bacteria. **Marine drugs**, v. 15, n. 6, E.167, p. 1-11, 2017.
- KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **Br. J. Dermatol.**, v. 147, n. 6, p. 1212-1217, 2002.
- KÜLKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.
- KULMANN, I.S. **Preparação e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo metronidazole e óleo de melaleuca co-encapsulados**. 85f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pampa. Uruguai, 2018).
- KWON H, YOON J, PARK S, MIN S. Comparison of clinical and histological effects between Lactobacillus-fermented *Chamaecyparis obtusa* and tea tree oil for the treatment of acne: an eight-week double-blind randomized controlled split-face study. **Dermatology**, v. 229, n. 2, p. 102–109, 2014.
- LAN, Y.; LI, H.; CHEN, Y.Y.; ZHANG, Y.W.; LIU, N.; ZHANG, Q.; WU, Q. Essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and its main components used as transdermal penetration enhancers: a comparative study. **J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)**, v. 15, n. 11, p. 940-952, 2014.
- LARA, V.C.D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. 103f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T.de. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 97, Pt A, p. 152-163, 2015.

LEE, C-J.; CHEN, L-W.; CHEN, L-G.; CHANG, T-L.; HUANG, C-W.; HUANG, M-C.; WANG, C-C. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, p. 169-176, 2013.

LEITE, E.A. **Nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo da cardiotoxicidade**. 164f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2006.

LEITE, E.A.; VILELA, J.M.C.; MOSQUEIRA, V.C.F.; ANDRADE, M.S. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Microsc. Microanal.**, v. 11, (supp 3), p. 48-51, 2005.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 327-341, 2004.

LEMOES, D.R.H. **Influência da temperatura do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel**. Tese (Título de “*Magister Scientiae*”) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An. Bras. Dermatol.**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LIAO, M.; XIAO, J.J.; ZHOU, L.J.; LIU, Y. WU, X.W.; HUA, R.M.; WANG, G.R.; CAO, H.Q. Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. 1-19, dec. 2016.

LIMA, M.L.; ALBUQUERQUE, C.N.de. Preparo e caracterização de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo megazol, agente anti-chagásico. **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, n. 4, p. 493-498, 2012.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: Importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14-24, 2007.

LIMA, R.S.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana/insulina**. Tese (Doutora em Engenharia de Processos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2010.

LIU, P.F.; HSIEH, Y.D.; LIN, Y.C.; TWO, A.; SHU, C.W.; HUANG, C.M.

Propionibacterium acnes in the pathogenesis and immunotherapy of acne vulgaris. **Curr. Drug Metab.**, v. 16, n. 4, p. 245-54, 2015.

LORCA, B.daS.eS. **Desenvolvimento e avaliação de sabonete granulado para limpeza da pele**. 115f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.

LOUCHARD, B.O.; SILVA, A.R.A.e; MOREIRA, L.K.A. Obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo 1,8-cineol (eucaliptol) pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. **27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**. São Paulo, 2014. p. 1-7.

LU, X.; LIU, L. Asymmetric polyplex-nanocapsules loaded with photosensitizer for light-assisted gene transfer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 174, p. 269–275, 2017.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in-vivo* delivery of drugs and vaccines. **J. Nanobiotechnology**, v. 9, n. 55, p. 1-11, 2011.

MALHI, H.K.; TU, J.; RILEY, T.V.; KUMARASINGHE, S.P.; HAMMER, K.A.

Tea tree oil gel for mild to moderate acne; a 12 week uncontrolled, open-label phase II pilot study. **Australas J. Dermatol.**, v. 58, n. 3, p. 205-210, 2017.

MARCO, S.L.de. **Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados**. 116f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

MIRANTE, D.C. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de micropartículas de polilisina e de nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)**. 89f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2015.

MARINI, V.G. **Nanopartículas de zeína: Preparação, caracterização e desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de terpinen-4-ol**. Tese (Doutor em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Física e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

MARTÍNEZ-RIVAS, C.J.; ÁLVAREZ-ROMÁN, R.; RIVAS-MORALES, C.; ELAISSARI, A.; FESSI, H.; GALINDO-RODRÍGUEZ, S.A. Quantitative aspect of *Leucophyllum frutescens* fraction before and after encapsulation in polymeric nanoparticles. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, n. 5, p. 1-7, 2017.

MARTINS, J.A.S.; SAGATA, E.; SANTOS, V.A.; JULIATTI, F.C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Biosci. J.**, v. 27, n. 1, p. 49-51, jan./feb. 2010.

MARTINS, V.deC.; BRAGA, E.C.deO.; GODOY, R.L.deP.; BORGUINI, R.G.; PACHECO, S.; SANTIAGO, M.C.P.deA.; NASCIMENTO, L.daS.deM.do. Nanotecnologia em alimentos: uma breve revisão. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 25-42, 2015.

MEDEIROS, F.C.M.de. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do cerrado contra fungos xilófagos**. 120f. Dissertação (Mestre) – Pós-Graduação em Ciências Florestais, Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.de; CASTRO, H.F.de; GIORDANO, R.deL.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIRANDA, S.H.S.de. **Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Diretrizes modernas no tratamento da acne vulgar: da abordagem inicial à manutenção dos benefícios clínicos. **Surg. Cosmet. Dermatol.**, v. 2, n. 3, p. 205-2013, jul./sep. 2010.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A.W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 54, n. 3, p. 281-284, 2002.

MONTEIRO, M.H.D.A.; MACEDO, H.W.de; SILVA JUNIOR, A.da; PAUMGARTTEN, F.J.R. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de *Melaleuca* L. (Myrtaceae Juss.). **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 1-72, 2013.

MOREIRA, T.M.S. **Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)**. 158f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.

MÜLLER, C.R.; HAAS, S.E.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; PERALBA, M.doC.R.; POHLMANN, A.R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

NAGARWAL, R.C.; SINGH, P.N.; KANT, S.; MAITI, P.; PANDIT, J.K. Chitosan nanoparticles of 5-fluorouracil for ophthalmic delivery: Characterization, *in vitro* and *in vivo* study. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, n. 2, p. 272-278, 2011.

NAKAYAMA, K.; MURATA, S.; ITO, H.; IWASAKI, K.; VILLAREAL, M.O.; ZHENG, Y.W.; MATSUI, H.; ISODA, H.; OHKOHCHI, N. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 2015-2024, aug. 2017.

NAND P, DRABU S, GUPTA RK. Antimicrobial investigation of *Linum usitatissimum* for the treatment of acne. **Nat. Prod. Commun.**, v. 6, n. 11, p. 1701-1704, 2011.

NEVES, J.R.; FRANCESCONI, F.; COSTA, A.; RIBEIRO, B.deM.; FOLLADOR, I.; ALMEIDA, L.M.C. *Propionibacterium acnes* e a resistência bacteriana. **Surg. Cosmet. Dermatol.**, v. 7, n. 3, Supl.1, S27-38, 2015.

NGUYEN, T.A., EICHENFIELD, L.F. Profile of clindamycin phosphate 1.2%/benzoyl peroxide 3.75% aqueous gel for the treatment of acne vulgaris. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, v. 29, n. 8, p. 549-554, 2015.

NICARETA, C. Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros. 92f. Dissertação (Mestre em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

NIKOLIĆ, M.; MARKOVIĆ, T.; MARKOVIĆ, D.; PERIĆ, T.; GLAMOČLIJA, J.; STOJKOVIĆ, D.; SOKOVIĆ, M. Screening of antimicrobial and antioxidant activity of commercial *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 22, p. 3852-3858, jun. 2012.

OLIVEIRA, A.C.M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T.C.; NOGUEIRA, M.N.M.; BEDRAN, T.B.L.; ANDRADE, C.R.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.

OLIVEIRA, R.F.de. **Adapaleno e tazaroteno: uma revisão sobre o uso destes retinóides de terceira geração.** 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pré-requisito para graduação em Farmácia – Disciplina de estágio curricular). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

OLIVEIRA, Y.de. **Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel.** 92f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

OURIQUE A.F.; MELERO, A.; SILVA, C.deB.da; SCHAEFER, U.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C.M.; KOSTKA, K.H.; BECK, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 95–101, 2011.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; HASSAN, Y.; KRAUSE, S.T.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W.J. Four terpene synthases contribute to the generation of chemotypes in tea tree (*Melaleuca alternifolia*). **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 160, p. 1-14, 2017.

PALMIERO, U.C.; KACZMAREK, J.C.; FENTON, O.S.; ANDERSON, D.G. Poly(β -amino ester)-*co*-poly(caprolactone) terpolymers as nonviral vectors for mRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. **Adv. Healthcare Mater**, v. 7, n. 14, p. 1-6, 2018.

PARK, C-E.; PARK, D-J.; KIM, B-K. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 24, n 5, p. 1725-1733, 2015.

PATEL, M; BOWE, W.P.; HEUGHEBAERT, C.; SHALITA, A.R. The development of antimicrobial resistance due to the antibiotic treatment of acne vulgaris: a review. **J. Drugs Dermatol.**, v. 9, n. 6, p. 655-664, 2010.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, part B, p. 417-426, 2015.

PAZYAR N, YAGHOOBI R, BAGHERANI N, KAZEROUNI A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **Int. J. Dermatol.**, v. 52, n. 7, p. 784-790, 2013.

PEREIRA, I.O.; BINSFELD, P.C. Nanomedicamentos: O cenário de regulamentação no Brasil. 15f. Especialização em Vigilância Sanitária, Instituto de Estudos Farmacêuticos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2012-2013.

PEREIRA, M.F.; RONCADA, E.M.; OLIVEIRA, C.M.de; MONTEIRO, R.; ABREU, M.A.M.M.de; ORTIGOSA, L.C. Acne fulminans e isotretinoína – Relato de caso. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 5, p. 883-985, set./out. 2011.

PEREIRA, R.L.; LEITES, F.I.; PAESE, K.; SPONCHIADO, R.; MICHALOWSKI, C.B.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. Hydrogel containing adapalene and dapson loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, *in vitro* irritation and permeation studies. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 42, n. 12, p. 2001-2008, 2016.

PERRY, A.L.; LAMBERT, P.A. *Propionibacterium acnes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 185-188, mar. 2006.

PLATSIDAKI, E.; DESSINIOTI, C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. **F1000Res**, v. 19, n. 7, p. 1-12, 2018.

POHLMANN, A.R.; FONSECA, F.N.; PAESE, K.; DETONI, C.B.; CORADINI, K.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POPIOLSKI, T.M. Desenvolvimento de nanopartículas contendo óleos essenciais antibacterianos para adsorção em fibras têxteis. 145f. Tese (Doutora em Ciências e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

PRADO, L.B.; HUBER, S.C.; BARNABÉ, A.; BASSORA, F.D.S.; PAIXÃO, D.S.; DURAN, N.; ANNICHINO-BIZZACHI, M. Characterization of PCL and chitosan nanoparticles as carriers of enoxaparin and its antithrombotic effect in animal models of venous thrombosis. **Journal of Nanotechnology**, v. 2017, n. 2, p. 1-7, 2017.

PYELL, U.; JALIL, A.H.; PFEIFFER, C.; PELAZ, B.; PARAK, W.J. Characterization of gold nanoparticles with different hydrophilic coatings via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part I: Determination of the zeta potential employing a modified analytic Approximation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 450, p. 288-300, 2015.

RAAFAT, D.; BARGER, K.V.; HAAS, A.; SAHL, H-G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol*, v. 74, n. 23, p. 3764-3773, 2008.

RAMAN, A.; WEIR, U.; BLOOMFIELD, S.F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 21, n. 4, p. 242-245, 1995.

RAMOS, I.M.F.C. **Nanopartícula polimérica funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. 241f. Tese (Doutora em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2018.

RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; JUSTO, G.Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36-40, 2012.

RUTHERFORD, T.; NIXON, R.; TAM, M.; TATE, B. Allergy to tea tree oil: retrospective review of 41 cases with positive patch tests over 4.5 years. **Australas J. Dermatol.**, v. 48, n. 2, p. 83-87, 2007.

SALLER, R.; BERGER, J.; REICHLING, J.; HARKENTHAL, M. Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. **Phytomedicine**, v. 5, n. 6, p. 489-495, 1998.

SANTOS, C.M.P.dos. **Nanoencapsulação de ingredientes activos em cosmetologia**. 57f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2012.

SANTOS, D.Y.A.C. **Botânica aplicada: Metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. 124f. Título de Livre-Docente. Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

SCHAFFAZICK, S.R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melanina**. 276f. Tese (Doutora em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.deL.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.deL.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.dos; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 80-85, 2005.

SCHOLZ, C.F.P.; KILLIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4422–4432, 2016.

SEDEKY, A.S.; KHALIL, I.A.; HEFNAWY, A.; EL-SHERBINY, I.M. Development of core-shell nanocarrier system for augmenting piperine cytotoxic activity against human brain cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 118, p. 103–112, 2018.

SILVA, A.M.F.da; COSTA, F.P.da; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade**, v. 9, n. 30, p. 54-63, 2014.

SILVA, C.A.L.da. **Avaliação da permeação cutânea de adapaleno a partir de diferentes formulações comerciais**. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

SILVA, C.J.da. **Morfoanatomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca L.* (Myrtaceae)**. 89f. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

SILVA, E.L.; CARNEIRO, G.; ARAÚJO, L.A.de; TRINDADE, M.D.E.J.; YOSHIDA, M.I.; ORÉFICE, R.L.; FARIAS, L.D.E M.; CARVALHO, M.A.de; SANTOS, S.G.dos; GOULART, G.A.; ALVES, R.J.; FERREIRA, L.A. Solid lipid nanoparticles loaded with retinoic acid and lauric acid as an alternative for topical treatment of acne vulgaris. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 5, n. 1, p. 792-799, 2015.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.dos; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SIMÕES, R.P.; GROppo, F.C.; SARTORATO, A.; FIOL, F.S.D.; FILHO, T.R.M.; RAMACCIATO, J.C.; RODRIGUES, M.V.N. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Rev. Lecta.**, v.20, n. 2, p. 143-152, jul./dez. 2002.

SIMONART, T. Newer approaches to the treatment of acne vulgaris. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 13, n. 6, p. 357-364, dec. 2012.

SIQUEIRA, N.M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 130f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

SÖDERBERG, T.A.; JOHANSSON, A.; GREF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. **Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 99-109, 1996.

SOUZA, M.E.de. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 76f. Dissertação (Mestre em Nanociências) – Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2014.

SPAREMBERGER, R.M.; MELO, L.D.W.de; SILVA, A.P.T.da; BULHÕES, L.O.S. Análise físico-química de nanocápsulas contendo óleo de semente de uva em diferentes concentrações. **Disciplinarum Scientia**, Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, v. 14, n. 1, p. 123-130, 2013.

STAINMESSE, S.; ORECCHIONI, A.M.; NAKACHE, E.; PUISIEUX, F.; FESSI, H. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. **Colloid Polym. Sci.**, v. 273, n. 5, p. 505-511, 1995.

STANGARLIN, M.F.L. **Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona**. 115f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2014.

STECANELLA, L.A. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo grandisina**. 72f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2011.

SWORDS, G.; HUNTER, L.K. Composition of Australian tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **J. Agric.Food Chem.**, v. 26, n. 3, p. 734-737, 1978.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G.M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 5, suppl. 2, p. 19-28, jan. 2013.

TAN, J.K.L.; BHATE, K. A global perspective on the epidemiology of acne. **British Journal of Dermatology**, v. 172, suppl. 1, p 3–12, 2015.

TAVARES, G.D. **Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N,N,N*-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro***. 214f. Tese (Doutor) – Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

TAVARES, G.D.; ISHIKAWA, G.M.; MONTEIRO, T.F.; ZANOLINI, C.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; BOU-CHACRA, N.A.; CONSIGLIERI, V.O. Derivative spectrophotometric method for determination of acyclovir in polymeric nanoparticles. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 203-206, 2012.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 56f. Dissertação (Mestre em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2011.

TAVARIA, F.K.; COSTA, E.M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M.F.; PINTADO, M.M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Rev. Bras. Eng. Biom.**, v. 29, n. 1, p. 110-120, mar. 2013.

THAKUR, K.; SHARMA, G.; SINGH, B.; CHHIBBER, S.; PATIL, A.B.; KATARE, O.P. Chitosan-tailored lipidic nanoconstructs of fusidic acid as promising vehicle for wound infections: an explorative study. **Int J Biol Macromol**, v. 115, p. 1012-1025, 2018.

THIBOUTOUT, D.; GOLLNICK, H.; BETOLLI, V.; DRÉNO, B.; KANG, S.; LEYDEN, J.J.; *et al.* New insights into the management of acne: An update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne Group. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, Supl. 5, p. S1- 50, 2009.

TRINDADE, I.C.; POUND-LANA, G.; PEREIRA, D.G.S.; OLIVEIRA, L.A.M.de; ANDRADE, M.S.; VILELA, J.M.C.; POSTACCHINI, B.B.; MOSQUEIRA, V.C.F. Mechanisms of interaction of biodegradable polyester nanocápsulas with non-phagocytic cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 124, p. 89-104, 2018.

TRIPATHI, S.V.; GUSTAFSON, C.J.; HUANG, K.E.; FELDMAN, S.R. Side effects of common acne treatments. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 12, n. 1, p. 39-51, 2013.

TOYNE, H.; WEBBER, C.; COLLIGNON, P.; DWAN, K.; KLJAKOVIC, M. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) resistance and antibiotic use in patients attending Australian general practice. **Australas J. Dermatol.**, v. 53, n. 2, p. 106-111, 2012.

VAZ, A.L. Acne vulgar: bases para o seu tratamento. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 19, n. 6, p. 561-570, 2003.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VICINI, L.F. SILVEIRA, R.S.; VALE, A.A.do; CAMPOS, J.M.S.de; REIS, A.C.; SANTOS, M.deO.; CAMPOS, V.R.; CARPANEZ, A.G.; GRAZUL, R.M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 14-19, 2014.

VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

VIEIRA, F.P.; TAVARES, G.D.; REDIGUIERI, C.F. **Estudos *in vitro* e *in vivo* aplicados aos sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos.** In: VIEIRA, F.P.; REDIGUIERI, C.F.; REDIGUIERI, C.F. (Org.). A regulamentação de medicamentos no Brasil. Artmed: São Paulo, 2013.

VINHAL, D.C.; ROBERTH, A.O.; ORTENCE, V.O.P.; DINIZ, D.G.A. Terapia retinóide na acne vulgar. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 3, p. 80-101, 2014.

von MÜHLEN, C. Índice de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 21-29, 2009.

WALSH, T.R.; EFTHIMIOU, J.; DRÉNO, B. Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. **Lancet Infect. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 23-33, 2016.

WANG, Z.H.; WANG, Z.Y.; SUN, C.S.; WANG, C.H.; JIANG, T.Y.; WANG, S.L. Trimethylated chitosan-conjugated PÇGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 908-915, 2010.

WANG, M.; ZHAO, J.; AVULA, B.; WANG, Y-H.; CHITTIBOYINA, A.G.; PARCHER, J.F.; KHAN, I.A. Quality evaluation of terpinen-4-ol-type australian tea tree oils and commercial products: An integrated approach using conventional and chiral GC/MS combined with chemometrics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 2674–2682, 2015.

WEBBOOK National Institute of Standards and Technology (NIST). Disponível em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em 28 de ago. 2018.

YADAV, N.; SINGH, A.; CHATTERJEE, A.; BELEMKAR, S. Evaluation of efficacy and safety of perfect face gel and perfect face tablets in management of acne. **J. Clin. Exp. Dermatol. Res.**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2011.


YOO, J.Y.; PARK, S.H.; HWANG, I.A.; JO, S.J.; HUH, C-H.; YOUN, S.W.; PARK, K.C. A clinical study on the effect of a cream containing *Ramulus mori* extract and tea tree oil on acne vulgaris and aerobic skin flora. **Korean J. Dermatol.**, v. 41, n. 9, p. 1136–1141, 2003.

ZANELATO, T.P.; GONTIJO, G.M.A.; ALVES, C.A.X.deM.; PINTO, J.C.C.L.; CUNHA, P.R. Acne fulminans incapacitante. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 4, supl. 1, p. 9-12, aug. 2011.

ZANOTTO FILHO, A. **Efeitos diferenciais do retinol e do ácido retinóico na proliferação, morte e diferenciação celular: o papel da mitocôndria e da xantina oxidase nos efeitos pró-oxidantes da vitamina A.** 82f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

ANEXO I – Laudo Técnico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

Lote 1



LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree)
(Melaleuca alternifolia)

Lote: 198	CAS Number: 68647-73-4
Fabricação: Março/2016	Validade: Março/2019

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,896	0,885 – 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,478	1,470 – 1,482
Rotação Ótica	+ 9,22°	[+5° ; +15°]
Data da Análise	11/04/2016	
Resultado	Aprovado	
Origem	Austrália	
Principais Componentes (aprox.)	Terpinen-4-ol = 42% Alpha terpinene = 10%	Gamma terpinene = 22% Cineol = 1,5 %
Extração	Destilação a vapor das folhas	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos. Não ingerir. Evitar contato do produto puro com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 60°C. Perigo de fogo se exposto ao calor ou fonte de ignição. O líquido pode provocar irritação nos olhos, aparelho respiratório e digestivo. Polui as águas e o solo. O envio ao esgoto é proibido. As águas de combate ao fogo podem causar poluição.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número da ONU: 1169 / Classe: 3 / LÍQUIDO INFLAMÁVEL

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Estado: Mineração Ouro Branco, 2017 • Vargem Grande, Paulista • SP • CEP: 06730-000
 Tel.: 11.4159.1784 / 11.4158.3544 • Fax: 11.4158.3420
 Men / e-mail: atendimento@ferquima.com.br
 www.ferquima.com.br

FERQUIMA
 Ind. e Com. Ltda