

Caracterização de uma microemulsão contendo um derivado do dilapiol extraído de *Piper aduncum* (Piperaceae)

Characterization of a microemulsion containing a dillapiole derivative extracted from *Piper aduncum* (Piperaceae)

Angela Maria Comapa Barros^{1*}, Ana Cristina da Silva Pinto¹, Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos¹, Fernanda Guilhon-Simplicio¹, Jesús Rafael Rodríguez Amado³, Francisco Célio Maia Chaves⁴, Emerson Silva Lima¹, Antonia Maria Ramos Franco²

RESUMO

A nanotecnologia é uma inovação farmacêutica que visa veicular ativos em formulação microemulsinada com capacidade de liberar fármacos de forma modificada, uma alternativa para aplicação cutânea. O objetivo do estudo foi caracterizar uma microemulsão contendo um derivado de dilapiol (EBD) para administração tópica. Os componentes da formulação contendo o EBD (ME-EBD) foram padronizados, pesados e homogenizados por uma prancha agitadora em uma temperatura ambiente. A formulação foi analisada por Zetasizer Nano, para a centrifugação usou-se um tempo de 3 horas a 3500 rpm, na variação de temperatura avaliou de -4 °C a 25 °C. Foi obtido um diâmetro das partículas (45,1 nm), índice de polidispersão (0,286), condutividade (0,027 mS/cm) e potencial Zeta (-26,4 mV). Após a centrifugação não houve alterações significativas no diâmetro das partículas, assim como, nos ciclos alternados de gelo/degelo. A ME-EBD mostrou-se um sistema estável, de fase única, interfase O/A, gotículas <100 nm. Portanto, a microemulsão contendo o derivado de dilapiol mostrou ser uma alternativa para veiculação tópica de fármacos.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Formulação tópica; Carreador.

ABSTRACT

Nanotechnology is a pharmaceutical innovation that aims to deliver actives in microemulsion formulation with the ability to release drugs in a modified form, an alternative for cutaneous application. The aim of the study was to characterize a microemulsion containing a dillapiole derivative (EBD) for topical administration. The components of the formulation containing EBD (ME-EBD) were standardized, weighed and homogenized by a shaker board at room temperature. The formulation was analyzed by Zetasizer Nano, for centrifugation a time of 3 hours at 3500 rpm was used, in the temperature range evaluated from -4 °C to 25 °C. Particle diameter (45.1 nm), polydispersion index (0.286), conductivity (0.027 mS/cm) and Zeta potential (-26.4 mV) were obtained. After centrifugation, there were no significant changes in the diameter of the particles, as well as in the alternating ice/thaw cycles. ME-EBD proved to be a stable, single-phase system, O/W interphase, droplets <100 nm. Therefore, the microemulsion containing the dillapiole derivative proved to be an alternative for topical delivery of drugs.

Keywords: Nanotechnology; Topical formulation; Carrier.

¹Universidade Federal do Amazonas

*E-mail: angelacomapafel@gmail.com

²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

INTRODUÇÃO

Na área farmacêutica, o avanço da nanotecnologia é responsável por trazer muitas inovações no desenvolvimento de formulações com alto desempenho, como as nano e microemulsões (LOBÃO, 2011), que podem modificar profundamente a velocidade de liberação do princípio ativo, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade, absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos, alterando os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica dos medicamentos (FORMARIZ et al., 2005; LEMOS et al., 2021).

As microemulsões são formulações de emulsificação espontânea entre água e óleo em sistemas termodinamicamente estáveis, graças à presença de um cotensoativo acessório ao tensoativo principal, que auxilia na estabilização da tensão interfacial entre as fases (FLORENCE e ATTWOOD, 2011). A grande dificuldade no desenvolvimento de microemulsões está na seleção e a proporção entre tensoativo e cotensoativo, que precisam ser bem avaliadas para se alcançar a microemulsificação espontânea de um sistema (JACINTO, 2018). Além disso, deve-se optar por constituintes que não apresentem risco de toxicidade, conforme a via de administração pretendida (McCLEMENTES, 2012; FORMARIZ et al., 2005). Dessa forma, utilizar componentes não tóxicos que sejam capazes de formar MEs que satisfaçam os requisitos de um bom veículo para a via de administração desejada (KREILGAARD, 2002), torna-se um desafio complexo e inovador.

As microemulsões podem ser empregadas na veiculação de produtos naturais, como a piperina, substância derivada de *Piper nigrum* (pimenta-preta), que foi veiculada em uma formulação microemulsionada e se mostrou bastante promissora no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, diminuindo a carga parasitária no fígado e baço em 78 e 75%, respectivamente (VEERAREDDY; VOBALABOINA; NAHID, 2004). Também encontram aplicação pela via ocular, quando uma microemulsão contendo ciclosporina apresentou melhor molhabilidade ocular e prolongou a permanência do fármaco em contato com a córnea (GAN et al., 2009). A escolha de óleos com propriedades terapêuticas potencializam a ação farmacológica do veículo, como a microemulsão desenvolvida com óleo de babaçu, que pode oferecer uma nova alternativa no tratamento de doenças antiinflamatórias ou infecções microbianas (REIS, 2013). As microemulsões ainda tem relevância como veículo para antifúngicos de uso tópico (CARNICEL, 2014).

Diante de uma biodiversidade do bioma Amazônico, pesquisadores têm investigado bioativos de plantas como a *Piper aduncum* muito utilizada com finalidade medicinal, encontrada naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica do Brasil (SANTOS et al., 2013). Dessa planta é extraído um óleo essencial, rico em dilapiol, um fenilpropanóide (MAIA et al., 1998). Um produto natural que pode ser modificado estruturalmente por reações de semissíntese para obtenção de novos derivados (NEWMAN e CRAGG, 2016). Portanto, o estudo teve como objetivo caracterizar uma microemulsão contendo um derivado do dilapiol para administração tópica.

METODOLOGIA

Obtenção do EBD

O dilapiol foi isolado das folhas de *P. aduncum*, cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental. O derivado éter *n*-butil dilapiol (EBD) foi preparado por semissíntese a partir do dilapiol extraído, em reação de oximercuriação, utilizando-se metodologia já descrita na literatura (TOMAR, MAHESHWARI, MUKERJEE, 1979a, b).

Preparação da microemulsão

A microemulsão foi preparada mediante leve agitação mecânica entre polisorbato 80 (tensoativo principal), álcool etílico (cotensoativo), água destilada (fase hidrofílica) e ácido oleico (fase lipofílica), conforme metodologia descrita por JACINTO (2018). Em seguida, adicionou-se o EBD e manteve-se sob agitação até a completa incorporação.

Caracterização das microemulsões placebo e contendo o éter *n*-butil dilapiol (EBD)

Diâmetro de partículas

O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram medidos pela técnica Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) usando um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). A microemulsão (100 µL) foi diluída em água destilada (700 µL), mediante agitação em vortex por cerca de um minuto. As medições foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos como a média e seu respectivo desvio padrão (RODRIGUEZ et al., 2017).

Análise do potencial Zeta e condutividade

A microemulsão (100 µL) foi diluída em água destilada (900µL), mediante agitação em vortex por cerca de um minuto. A microemulsão diluída foi colocada em uma célula descartável de polycarbonato e analisada usando um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern,UK), na voltagem de 150 V. O potencial Zeta e a condutividade foram medidos em triplicatas e os valores foram expressos como a média e seu respectivo desvio padrão.

Efeito do pH sobre o potencial Zeta e o diâmetro de partículas

O efeito da variação do pH sobre o potencial Zeta foi avaliado usando a técnica de titulação, acoplando um titulador MPT-2 (Malvern, UK) ao Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). As microemulsões foram diluídas com água bidestilada, na proporção 1:9 (v/v), para um volume final de 10 mL. Soluções de hidróxido de sódio a 0,25 mol/L e ácido clorídrico a 0,25 mol/L foram usadas como agentes titulantes na variação do pH do meio. O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão de pHs 4, 7 e 10. A cada intervalo de uma unidade de pH, na faixa entre pH 1 e 10, e à temperatura de 25 °C, o potencial Zeta e o diâmetro de partículas foram medidos, em triplicata, para a construção dos gráficos de variação do potencial Zeta e do diâmetro de partículas em função do pH do meio.

Efeito da força iônica sobre o potencial Zeta e o diâmetro de partículas

Os gráficos de variação do potencial Zeta e do diâmetro de partículas em função da força iônica do meio foram construídos usando Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). As amostras foram preparadas diluindo 0,5 mL da microemulsão com 4,5 mL de solução de cloreto de sódio em várias concentrações (50, 100, 200, 300, 400 e 500 mM). Cada diluição foi agitada em vortex por 2 minutos e deixadas em repouso por 72 horas. Após esse período, foram medidos o potencial Zeta e o diâmetro das partículas, e os resultados, expressos como a média das triplicatas executadas para cada concentração de cloreto de sódio, foram plotados nos gráficos de variação do potencial Zeta e do diâmetro de partículas em função da força iônica do meio.

Teste de centrifugação

O teste de centrifugação da microemulsão foi conduzido em centrífuga (Hitachi, Japão). A microemulsão (1mL) foi colocada em tubos de vidro de 2 mL e centrifugadas

durante 3 horas a 3500 rpm. Após esse tempo, os tubos foram observados para verificar a ocorrência ou não de separação de fases. Em seguida, o tubo foi novamente submetido à centrifugação, repetindo-se o processo por mais duas vezes para aumentar o estresse sobre a amostra. Ao final do processo, a microemulsão foi analisada, em triplicata, no Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) para verificar o diâmetro das partículas após o estresse de centrifugação.

Teste de estabilidade preliminar por ciclos alternados de gelo/degelo.

A microemulsão (1 mL) foi colocada em tubos de vidro de 2 mL e submetidas a três ciclos alternados de congelamento (-4°C , por 5 horas) e descongelamento até 25°C . Após cada ciclo, observou-se o estado físico da amostra e o diâmetro das partículas foi medido, em triplicata, no Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

RESULTADOS

Obtenção do EBD

A substância EBD isolada teve rendimento de 4,1 g, representando 73% dos rendimentos teóricos da reação. O EBD é um óleo amarelo claro com fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5$, peso molecular de 296,35 g/mol e densidade de $1,094 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$ (dados obtidos por espectros de RMN – não mostrado).

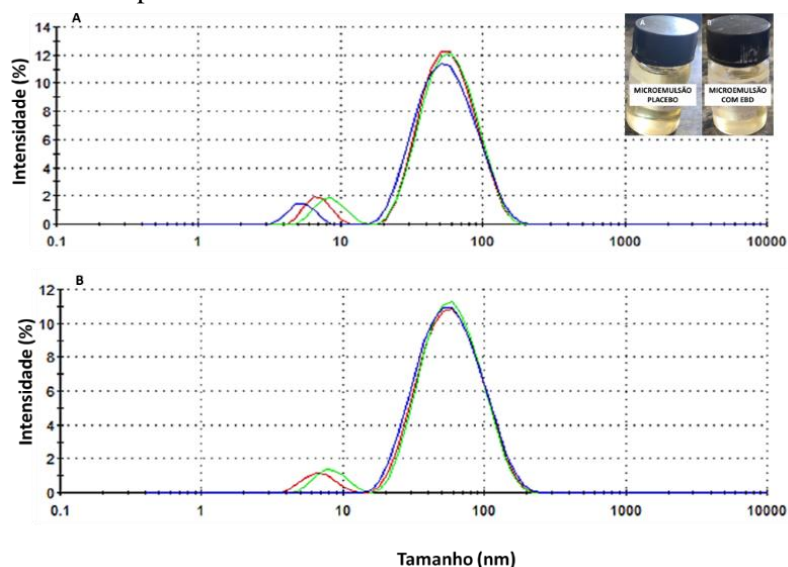
Preparação da microemulsão

As microemulsões foram obtidas à temperatura ambiente e apresentaram-se macroscopicamente límpidas, translúcidas e sem separação de fases, tanto a microemulsão placebo (MP) como a microemulsão contendo o EBD (ME-EBD).

Diâmetro de partículas e índice de polidispersão

As microemulsões MP e ME-EBD apresentaram diâmetro médio das partículas de, respectivamente, $42,77 \pm 1,28 \text{ nm}$ e $45,14 \pm 2,17 \text{ nm}$ (Figura 1). O índice de polidispersão calculado pelo equipamento foi de $0,284 \pm 0,004$ para MP e $0,286 \pm 0,004$ para ME-EBD.

Figura 1- Análises do tamanho de partículas e índice de polidispersão. A- microemulsão placebo. B- microemulsão contendo o EBD.

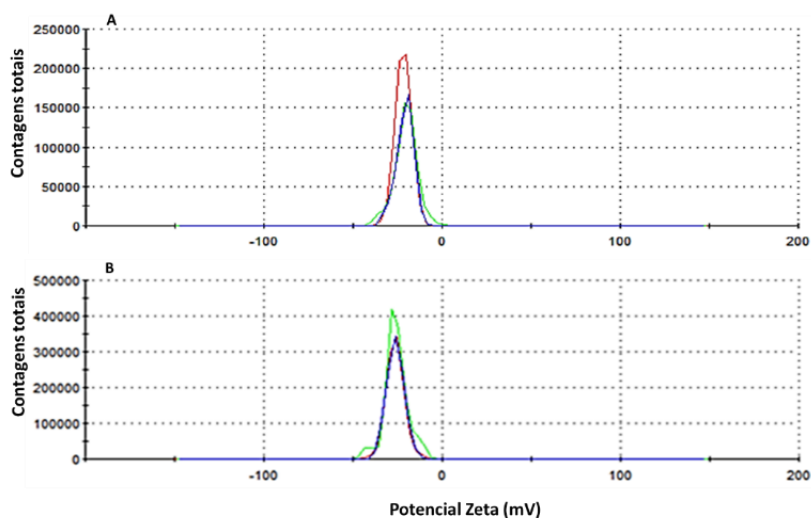


Fonte: Autoria própria (2023)

Potencial Zeta e condutividade

O potencial Zeta, que representa as características elétricas na superfície das partículas, foi de $-21,9 \pm 2,54$ mV para MP e $-26,4 \pm 1,21$ mV para ME-EBD (Figura 2). A condutividade medida para MP, de $0,027 \pm 0,008$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, e para a ME-EBD, de $0,033 \pm 0,005$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, permite concluir que se trata de sistemas do tipo óleo em água (fase externa aquosa).

Figura 2- Análise do potencial Zeta e condutividade. A- microemulsão placebo. B- microemulsão contendo o EBD.



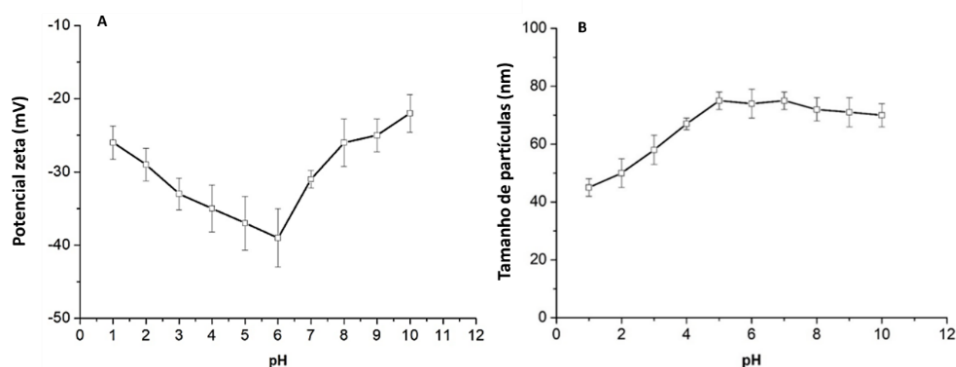
Fonte: Autoria própria (2023)

Efeito do pH sobre o potencial Zeta e tamanho das partículas

O efeito da variação do pH sobre as propriedades da ME-EBD mudou de forma gradual. O potencial Zeta, que era -26,4 mV no pH 1, aumentou gradativamente a sua carga negativa até o pH 6 (-38 mV), a partir do qual o potencial Zeta começa a perder carga negativa e chegar em torno de -23 mV até o pH 10 (Figura 3A).

O efeito da variação do pH sobre o diâmetro de partículas da ME-EBD mostrou um leve aumento a partir do pH 1 até o pH 5, de 45 a 75 nm, e a partir do pH 5 tende a se manter relativamente estável, variando de 75 a 70 nm até o pH 10 (Figura 3B).

Figura 3- Efeito do pH sobre o potencial Zeta (A) e o tamanho das partículas (B) da ME-EBD.



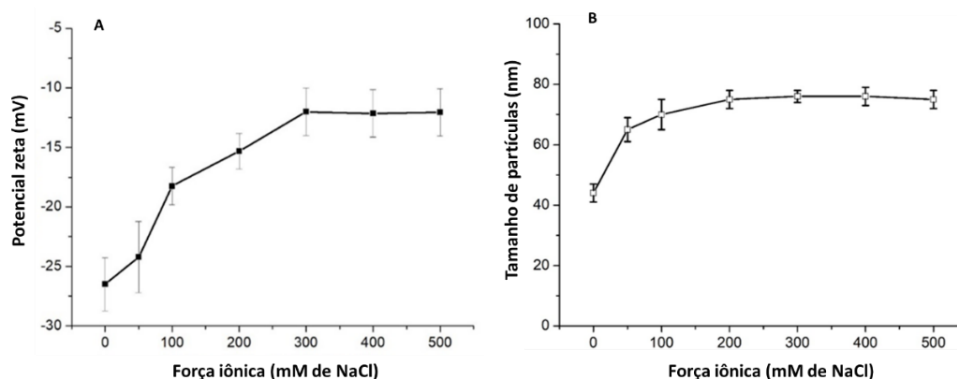
Fonte: Autoria própria (2023)

Efeito da força iônica sobre o potencial Zeta e o tamanho das partículas da ME-EBD

O efeito da força iônica sobre o potencial Zeta da ME-EBD é apresentado na Figura 4A, que mostra que o aumento da concentração de eletrólitos (no caso, íons Na^+ e Cl^- provenientes do cloreto de sódio) provoca diminuição da carga negativa das partículas, passando de -26,5 mV a -12,05 mV.

Por meio de uma solução ajustada de cloreto de sódio nas concentrações seriadas de 0 a 500 mM, pode-se verificar que a força iônica da solução interferiu no tamanho de partículas até a concentração de 200 mM de cloreto de sódio, quando o diâmetro passou de 45 nm para 75 nm (Figura 4B). Em concentrações acima de 200 mM, o tamanho das partículas da ME-EBD tende a se manter estável em 75 nm.

Figura 4- Efeito da força iônica sobre o potencial Zeta (A) e o tamanho das partículas (B) da ME-EBD.



Fonte: Autoria própria (2023)

Teste de centrifugação da ME-EBD

Após três ciclos de centrifugação a 3500 rpm, com 3 horas de duração cada, a ME-EBD manteve suas características iniciais, apresentando-se transparente, homogênea e sem separação de fases. Ao final do processo, foram medidos o diâmetro das partículas ($52,25 \pm 4,85$ nm) e o Índice de polidispersão ($0,255 \pm 0,025$ nm), demonstrando que não houve alterações significativas em relação à ME-EBD antes da centrifugação.

Teste de estabilidade preliminar da ME-EBD por ciclos alternados de gelo/degelo

As três replicatas estudadas permaneceram estáveis após os 3 ciclos de congelamento/ descongelamento. Não se observou separação de fase, nem mudanças de coloração. Após o último ciclo do teste, a ME-EBD apresentou diâmetro da partícula de $58,25 \pm 9,82$ nm e índice de polidispersão de $0,320 \pm 0,003$.

DISCUSSÃO

As microemulsões são definidas como sistemas nanoestruturados, termodinamicamente estáveis, isotrópicas, transparentes ou translúcidas, compostas por um tensoativo, associado ou não a um cotensoativo apropriado, gerando uma interface óleo/água, que pode se organizar em gotículas de água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), com diâmetro da partícula inferior a 100 nm (CARVALHO et al., 2016; ZHU et al., 2008; LAWRENCE, 1994). A microemulsão contendo éter *n*-butil dilapiol (ME-EBD) formou-se espontaneamente mediante leve agitação mecânica dos constituintes à

temperatura ambiente, apresentando-se, visualmente, límpida, translúcida e homogênea, sem separação de fase, e foi caracterizada quanto ao tamanho das partículas

Segundo ANSEL et al., (1999), as microemulsões são transparentes ou translúcidas em virtude de suas gotículas apresentarem tamanho inferior a 100 nm. O tamanho médio das partículas da MP foi de $42,77 \pm 1,28$ nm, e do ME-EBD, $45,14 \pm 2,17$ nm. A proximidade desses valores mostra que o EBD não interferiu na estabilidade da microemulsão. Estudos tem mostrado que a uniformidade do diâmetro das gotículas dentro de uma formulação é determinada pelo índice de polidispersão, de modo que, quanto maior o valor numérico do índice, maior a variação de tamanho entre populações de gotículas com diferentes diâmetros (JADHAV et al., 2010). As microemulsões estudadas apresentaram dois picos de variação do diâmetro das gotículas, gerando baixos índices de polidispersão, que foram de $0,284 \pm 0,004$ para MP e $0,286 \pm 0,004$ para a ME-EBD. Estudo de RODRIGUES (2012) sugere que o valor ideal para sistemas microemulsionados seja inferior a 0,3. A distribuição do tamanho das partículas influencia a viscosidade, a estabilidade e aspecto óptico de uma emulsão, que são importantes características para o seu processamento e funcionalidade (HOLLINGSWORT; JOHNS 2003; JURADO et al., 2007).

O teste do potencial Zeta é muitas vezes, a melhor representação das características elétricas de uma partícula de uma emulsão porque ele leva em conta a adsorção de quaisquer contra-íons carregados. O potencial Zeta é proporcional de dupla camada, que não pode ser medido diretamente e está relacionado a estabilidade das partículas, devido à criação de um efeito repulsivo entre as partículas evitando os processos de floculação e posterior coalescência (RIEGER, 2001; ALMEIDA, 2012). O potencial Zeta medido para as microemulsões mostram que MP e ME-EBD tem valores muito próximos, de $-21,9 \pm 2,54$ mV e $-26,4 \pm 1,21$ mV, respectivamente. A maior carga negativa da ME-EBD indica que a incorporação do EBD aumentou a carga negativa, aumentando os efeitos repulsivos entre as cargas negativas, o que evita a aproximação das partículas em processos de instabilidade. Quanto à condutividade, os valores medidos para MP ($0,027 \pm 0,008 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e ME-EBD ($0,033 \pm 0,005 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) permite dizer que as microemulsões são do tipo óleo em água (fase externa aquosa). A estabilidade das formulações é um ponto crucial no que diz respeito à liberação e eficácia dos fármacos, pois, em sistemas emulsionados, a inversão de fases pode afetar na liberação do fármaco tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AZZINI, 1999).

O efeito do pH sobre o potencial Zeta mostrou que a maior carga negativa ocorreu em pH 6. Além da avaliação das características repulsivas entre as partículas, a determinação do potencial Zeta em função da variação de pH tem como objetivo determinar o ponto isoelétrico da microemulsão desenvolvida, que é definido como o pH no qual a partícula em suspensão tem carga eletrostática igual a zero (DINGER, 2006). Observou-se que o valor do potencial Zeta se aproxima de zero em pH igual a 1,0, sugerindo este como ponto isoelétrico da formulação. Outro ponto a ser observado é o de que o pH da formulação deve ser compatível à sua aplicação tópica, tendo em vista que os valores de tolerância biológica para aplicação de produtos cutâneos estão entre 5,5 a 8,0 (SILVA et al., 2009). No caso da pele humana, o pH é levemente ácido (4,6 – 5,8), o que contribui para a proteção da microflora da pele. A manutenção do pH do veículo próximo ao pH da pele diminui o risco de irritação cutânea (LEONARDI, 2002; GONÇALVES, 2014). A maior carga negativa das partículas em pH levemente ácido mostram que o pH de estabilidade das microemulsões são compatíveis com o pH fisiológico da pele.

A variação da força iônica da solução, mediante adição de cloreto de sódio nas concentrações de 50 a 200 mM, apresentou impacto sobre o tamanho das partículas, que variaram de 45 para 70 nm, mas permaneceu estável ao longo das demais concentrações. Quanto a força iônica sobre o potencial Zeta, o aumento da concentração de íons sódio e cloreto levou à diminuição da carga negativa do potencial Zeta, de -26,5 para -12,05 mV, o que não afetou a estabilidade da microemulsão. Segundo a teoria de DEBYE e HÜCKEL (1923), há uma dependência direta do potencial Zeta mostra uma com o comprimento de Debye, pois o aumento da força iônica leva a uma diminuição do comprimento de Debye e, conseqüentemente, a uma diminuição do potencial Zeta.

O teste de centrifugação de formulações farmacêuticas, conduzido a 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente, é importante para determinar a estabilidade do sistema, uma vez que, a centrifugação simula um aumento na força de gravidade, produz estresse na amostra, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando o surgimento de possíveis instabilidades (BRASIL, 2004). Após a execução de três ciclos de centrifugação, a ME-EBD continuou com sua cor transparente, homogênea, sem separação de fases, e sem diferenças significativas quanto ao tamanho das partículas ($52,25 \pm 4,85$ nm), índice de polidispersão ($0,255 \pm 0,025$ nm), o que confirma a estabilidade do sistema.

No teste de estabilidade preliminar, após o estresse térmico, não houve separação de fase nem mudanças de cor. Os resultados do tamanho das partículas ($58,25 \pm 9,82$ nm) e índice de polidispersão ($0,320 \pm 0,003$) mostraram pequena alteração se comparado aos parâmetros da microemulsão antes do teste, mas sem significância, já que, os valores permaneceram dentro dos valores de estabilidade descritos na literatura.

CONCLUSÃO

Por meio de diferentes técnicas combinadas foi possível caracterizar o sistema microemulsionado do estudo, concluindo que a incorporação do EBD na formulação não afeta a estabilidade do veículo. Essas evidências se justificam, pois a formulação manteve-se visualmente translúcida, com diâmetro de partículas inferior a 100 nm, um sistema isotrópico de fase única e estável à centrifugação e mudanças de temperaturas, além de ser fácil replicação e baixo custo de produção. Portanto, sugere-se que a ME-EBD mostrou uma alternativa para uso tópico e veiculação de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido das agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- AZZINI, R. G. Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácido carboxílicos. 1999. São Paulo,.169p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- AMADO, J. R. R.; PRADA, A. L.; DUARTE, J. L.; KEITA, H. K.; DA SILVA, H. R.; FERREIRA, A. M.; SOSA E. H. e CARVALHO, J. C. T. Development, stability and *in vitro* delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. Saudi Pharm J. 2017. Doi:10.1016/j.jsps.2017.07.008.
- BACHHAV, Y.G.; PATRAVALE, V. B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. Int J Pharm. 2009;365(1-2):175-9. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.021.
- BRASIL. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Anvisa. Brasília: Anvisa, v.1, p.52. 2004.

- CARNICEL, C. Preparação e caracterização de Microemulsões contendo fluconazol. 2014. Dissertação do Programa de Pós- Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Mato Grosso, 2014.
- CARVALHO, A. L. M. et al. Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. *J. Pharm. Sci.*, v. 105, n.7, p. 1-6. 2016. Doi: 10.1016/j.xphs.2016.04.013. Epub 2016 May 21.
- DEBYE, P. J. W.; HÜCKEL, E. A. A. J. Zur theorie der elektrolyte. *Physikalische Zeitschrift*, n. 24, p. 185-203, 1923. Doi: 10.4236/ajac.2018.99032.
- DINGER, D. Medidas de Pontos Isoelétricos sem o Uso de Analisador de Potencial Zeta. 2006. *Cerâmica Industrial*, v.11, n.3.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. 2ª Ed., São Paulo: Pharmabooks, 690 p. 2011.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.*, v.41, n.3, p.301-303. 2005. Doi.org/10.1590/S1516-93322005000300003.
- GAN, L.; GAN, Y.; ZHU, C.; ZHANG, X.; ZHU, J. Novel microemulsion *in situ* electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: *In vitro* and *in vivo* results. *Int J Pharm.* 2009;365(1-2):143-9. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.004.
- GONÇALVES, J. C. Nanotecnologia aplicada à pele. 2014 (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.
- HOLLINGSWORTH, K. G.; JOHNS, M. L. Measurement of emulsion droplet size using PFG NMR and regularization methods. *Journal of Colloids and Interface Science*, v.258, p. 383- 389. 2003. Doi: 10.1016/s0021-9797(02)00131-5.
- JACINTO, A. H. V. L. Desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de formulação microemulsionada para o tratamento de onicomicoses contendo óleos essenciais de *Melissa officinalis L. E Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. 2018. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- JURADO, E.; BRAVO, V.; CAMACHO, F.; VICARIA, J. M.; FERNANDEZ-ARTEAGA, A. Estimation of the distribution of droplet size, interfacial area and volume in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 295, p. 91-98. 2007. Doi:10.1016/j.colsurfa.2006.08.037.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, Supl. 1, p. 77-98, 2002. Doi: 10.1016/s0169-409x (02)00116-3.

- LAWRENCE, M. J.; EUR. J. Drug Metab. Pharmacokinet, 3, 257. 1994. Doi: 10.1007/BF03188929.
- LEMOS, J. A.; ANNA ELIZA, M. F. M. O.; ARAUJO, R. S.; TOWNSEND, D. M.; FERREIRA, L. A. M; BARROS, A. L. B. Recent progress in micro and nano-encapsulation of bioactive derivatives of the Brazilian genus *Pterodon*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. Doi: 10.1016/j.biopha.2021.112137.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E, ou de ceramíde, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 77, p. 563- 569. 2002. Doi.org/10.1590/S0365-05962002000500006.
- LOBÃO, E. B. Nanotecnologia aplicada a fármacos. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo.
- McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012. Doi: 10.1039/c2sm06903b.
- MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; LUIZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p.269-272.1998.
- NEWMAN, D.J. E CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, pp. 629-661. 2016.
- REIS, M.Y F.A. Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaço (*Orbignya phalerata*) para uso tópico. 2013. Conclusão de curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.
- RIEGER, M. M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Org.) Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, Cap. 17. 2001.
- RODRIGUES, A. R. O. Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais. 2012. Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas, Universidade do Minho, Braga, 2012.
- RODRIGUEZ, A. J. R; PRADA, A. L.; DUARTE, J. L.; KEITA, H.; DA SILVA, H. R.; FERREIRA, A. M.; SOSA, E. H.; CARVALHO, J. C. T. Development, stability, and *in vitro* delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi Pharm J*. 25: 1158–1168. 2017. Doi: 10.1016/j.jsps.2017.07.008.
- SANTOS, M. L. et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1275–8, 2013.

SILVA, J. A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*, v.32, n.6, p.1389-1393. 2009. Doi.org/10.1590/S0100-40422009000600005.

TOMAR, S.S.; MAHESHWARI, M.L.; MUKERJEE, S.K. Síntese e atividade sinérgica de alguns sinergistas de piretro de Dilapiol. ***Agricultural and Biological Chemistry***, v.43, n.7, p.1479-1483, 1979a.

TOMAR, S.S.; MAHESHWARI, M.L.; MUKERJEE, S.K. Síntese e atividade sinérgica de sinergistas de piretro à base de dilapiol. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.27, n.3, p.547-550, 1979b.

VEERAREDDY, P. R.; VOBALABOINA, V.; NAHID, A. Formulação e avaliação de emulsões óleo em água de piperina na leishmaniose visceral. *Pharmazie*, v. 59, p. 194-197. 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15074591/>.

ZHU, W.; YU, A.; WANG, W.; DONG, R.; WU, J.; ZHAI, G. Projeto de formulação de microemulsão para entrega dérmica de penciclovir. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 360, p. 184-190. 2008. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.008.