

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*:
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Cramer Flores

Santa Maria, RS, Brasil

2011

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*: DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÕES E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Fernanda Cramer Flores

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

Co-orientador: Clarice Madalena Bueno Rolim

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Melaleuca alternifolia*: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

elaborada por
Fernanda Cramer Flores

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiane de Bona da Silva, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Ruy Carlos Ruver Beck, Dr. (UFRGS)

Andréa Inês Horn Adams, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 15 de agosto de 2011.

*Aos meus pais e ao meu mano,
pelo amor e apoio incondicionais,
fazendo de tudo para que esse sonho
se tornasse possível. Ao meu avô, que,
com certeza, estaria muito orgulhoso
por essa etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao seu Bernardino (paizinho), pelas conversas sobre os mais variados assuntos (eu nunca ganho dele), pelas horas lixando cascos de ovelhas, pelo paitrocínio, pela amizade, pelo amor. À Joana Maria (mãezinha), criatura única, sempre alegre, atarefadíssima, me fazendo companhia no MSN às 7 da manhã, me dando bom dia, perguntando e falando pra todo mundo sobre as “nanotecnologias”. Nunca me esqueço: “me avisa quando vai ser publicado que eu vou comprar várias revistas”. Incansáveis, incondicionais, imprescindíveis. Falar com eles, todas as noites, faz meu dia valer a pena. Ao meu mano, que tantas vezes teve que agüentar minhas TPMs, meus nervosismos e ansiedades, me acalmando, outras vezes me irritando, afinal, irmão é pra essas coisas... Ao mano Black, pelos momentos em que jamais me deixou sentir sozinha. À minha família e amigos de Los Angeles, a quem, por muitas vezes tive que abdicar para estar aqui, lendo, pesquisando, trabalhando. Ao Gabi, agüentando o meu mau-humor, minhas incertezas, inseguranças, TPMs, o meu cansaço, minha ausência, por isso, sei que deve, muitas vezes, ter detestado este trabalho, mas manteve-se ali, firme e forte, me apoiando sempre. À Alemoa, amiga incansável, admirável. Ao Dedé, sempre me fazendo sorrir (não tem como não rir com ele, ou dele). À Ana Luíza, tornando meus dias mais “divers”, à Rô, pelo companheirismo e dedicação (inclusive, de I.C., foi promovida à madrinha), à Juh, para todas as horas. À todos que de certa forma contribuíram para cada resultado. Rose: carinho e unhas, muitas unhas; gurias do lab: vocês realmente sabem como fazer um mero laboratório se tornar o “Lab mais Mara”, fazendo com que os dias de leitura e escrita parecessem ainda mais solitários. Às minhas ICs Rô e Ju: com certeza este trabalho andou e tomou forma com a dedicação de vocês. À minha orientadora e amiga Cris, que nunca me deixou perder o foco, me iluminando com sua sabedoria, orientação, amizade, incentivo. Às parcerias que contribuíram para a evolução e execução de experimentos. Aos professores, aos colegas que me fizeram aprender, me enriquecendo com seu conhecimento e experiência. À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos.

De qualquer forma, sabemos que um trabalho de pesquisa não se faz sozinho. E de um jeito ou de outro, cada um dos acima citados (e aqueles, que cometi a injustiça de esquecer), foram imprescindíveis na elaboração deste trabalho, cada um fazendo a parte que lhe cabia. Muito obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E ATIVIDADE BIOLÓGICA

AUTORA: Fernanda Cramer Flores
ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva
CO-ORIENTADORA: Clarice Madalena Bueno Rolim
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de agosto de 2011.

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões (10 mg/mL) foram preparadas pelos métodos de deposição interfacial de polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente, e avaliadas em relação às suas características físico-químicas (tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e determinação do conteúdo de óleo). As formulações apresentaram rendimento em óleo de, aproximadamente, 96%, diâmetro médio nanométrico (160-200 nm), índice de polidispersão inferior a 0,25 e potencial zeta negativo. Os valores de pH foram de $6,43 \pm 0,37$ e $5,98 \pm 0,00$ para nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas, respectivamente. A nanoencapsulação do óleo apresentou uma maior proteção deste frente à volatilização. As análises de tamanho médio de partícula e índice de polidispersão não apresentaram alterações durante 60 dias de armazenamento, a uma temperatura de 25 °C, ao abrigo da luz. A avaliação da atividade antifúngica das formulações foi realizada, através do estudo do perfil de inibição do crescimento da levedura de *Candida albicans*. Adicionalmente, a atividade antifúngica também foi testada frente ao *Trichophyton rubrum*, utilizando dois diferentes modelos de infecção ungueal. O efeito das nanoestruturas na curva de crescimento da levedura demonstrou inibição e controle do crescimento. Nos modelos de infecção de unha foi possível evidenciar a habilidade das formulações em reduzir o crescimento do *T. rubrum*, obtendo-se resultados promissores para as nanocápsulas. O estudo de desenvolvimento de hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados propostos neste trabalho foi, também, realizado. As formulações semissólidas desenvolvidas apresentaram propriedades adequadas para aplicação tópica. Ainda, o efeito antiedematogênico tópico foi avaliado pela medida da espessura da orelha de camundongos antes e após 24 horas de exposição à radiação. Os hidrogéis contendo os sistemas coloidais desenvolvidos demonstraram atividade, ao passo que o gel contendo o óleo livre não apresentou efeito. Adicionalmente, o efeito cicatrizante *in vivo* dos hidrogéis foi avaliado através da regressão da área da ferida na pele de ratos. No modelo de cicatrização, o hidrogel contendo as nanocápsulas apresentou atividade superior ao controle positivo (hidrogel contendo alantoína). Análises de marcadores de estresse oxidativo demonstraram aumento nos níveis de glutatona, vitamina C e catalase após o tratamento com o hidrogel contendo as nanocápsulas preparadas com o óleo essencial de melaleuca.

Palavras-chave: *Melaleuca alternifolia*; nanocápsulas; nanoemulsões; hidrogéis.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

NANOSTRUCTURED SYSTEMS CONTAINING *Melaleuca alternifolia* ESSENTIAL OIL: FORMULATIONS DEVELOPMENT AND BIOLOGICAL ACTIVITY

AUTHOR: Fernanda Cramer Flores
ADVISER: Cristiane de Bona da Silva
CO-ADVISER: Clarice Madalena Bueno Rolim
Place and Date of Defense: Santa Maria, August 15, 2011.

The aim of this work was the development of nanostructured formulations containing *M. alternifolia* essential oil. Polymeric nanocapsules and nanoemulsions (10 mg/mL) were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer method and spontaneous emulsification, respectively. The formulations were evaluated in relation to their physicochemical characteristics (particle size, polydispersity index, zeta potential, pH and oil content). Formulations presented oil content of about 96%, nanometric mean size (160-220 nm), polydispersity index below 0.25 and negative zeta potential. The pH values were 6.43 ± 0.37 and 5.98 ± 0.00 for nanoemulsions and nanocapsules, respectively. The inclusion of oil in nanocapsules showed higher protection against volatilization. The analysis of mean size and polydispersity index of the formulations presented no significant alteration during 60 days of storage time (at 25 °C, protected from light). The *in vitro* antifungal activity of the formulations was evaluated through the study of the inhibition growth profile of *Candida albicans* yeast. In addition, the antifungal activity against *Trichophyton rubrum* was studied using two different *in vitro* models of dermatophyte nail infection. The effect of nanostructures on the growth curve of *C. albicans* showed inhibition and control of its growing. Nail infection models demonstrated the ability of the formulations in reducing the *T. rubrum* growth, and the inclusion of oil in nanocapsules was more efficient. The development of hydrogels containing the nanostructured systems were carried out. The semisolid formulations showed adequate properties for topical administration. The topical antiedematogenic effect was evaluated by ear thickness measurement before and 24 h after UVB radiation. Hydrogels containing the colloidal systems showed effect, unlike to hydrogel containing the free oil. The *in vivo* healing effect of hydrogels was evaluated by regression of the wound in the rat skin. Hydrogel containing the nanocapsules presented higher activity in comparison to the positive control (hydrogel containing allantoin). Analyses of the oxidative stress showed an increase of glutathione, vitamin C and catalase levels after the treatment with the hydrogel containing the nanocapsules prepared with melaleuca essential oil.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*; nanocapsules; nanoemulsions; hydrogels.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Estrutura esquemática da unha	19
FIGURA 2 – Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	24

PUBLICAÇÃO 1: Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial: proteção frente à volatilização

FIGURA 1 – Swelling experiment: films weight at time intervals	46
FIGURA 2 – TEM images of NC (a) (150,000 x; bar = 200 nm) and NE (b) (150,000 x; bar = 200 nm)	46
FIGURA 3 – Oil content in the NE, NC and emulsion after heat at 37 °C, during 15, 30 and 60 min	46

PUBLICAÇÃO 2: Efeito de suspensões de nanocápsulas contendo óleo de melaleuca no crescimento de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*

FIGURA 1 – Microbiological efficacy of formulations against <i>C. albicans</i> (yeast suspension at 10^3 - 10^4 CFU mL ⁻¹) (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; blank nanocapsules – C-NC; blank nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN)	56
FIGURA 2 – Microbiological efficacy of formulations against <i>C. albicans</i> (yeast suspension at 10^5 CFU mL ⁻¹) (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; blank nanocapsules – C-NC; blank nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN)	56
FIGURA 3 – Effect of nanostructures against <i>Trichophyton rubrum</i> in an <i>in vitro</i> human nail clipping infection model (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; blank nanocapsules – C-NC; blank nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN)	58
FIGURA 4 – Effect of nanostructures against <i>T. rubrum</i> in an <i>in vitro</i> onychomycosis experimental model (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; blank nanocapsules – C-NC; blank nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN)	59

PUBLICAÇÃO 3: Avaliação do efeito antiedematogênico tópico e na cicatrização de feridas da pele de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de óleo essencial de melaleuca

FIGURA 1 – Spreadability of hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free TTO (HG-TTO) and control hydrogels (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) 75

FIGURA 2 – Effect of hydrogels on the edematogenic responses induced by UVB radiation (0.5 J/cm²). Hydrogels containing nanocapsules and nanomulsions (HG-TTO-NC and HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). Each column represents the mean S.E.M. for 6 animals (** p ≤ 0.01 vs. un-treated mice) 76

FIGURA 3 – Percentage of wound healing area reduction in relation to basal. Hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). Data are shows by mean ± S.E.M (n = 6) 78

FIGURA 4 – Effect of hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) in dosage of antioxidants of the cutaneous lesions in rats. (A) glutathione levels, (B) vitamin C levels and (C) catalase activity 79

DISCUSSÃO GERAL

FIGURA 1- Fotografias das unhas infectadas com *T. rubrum*. Fragmento sem tratamento (A); tratamento realizado com a emulsão convencional (B) e a suspensão de nanocápsulas (C)..... 92

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO 1: Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial: proteção frente à volatilização

TABELA 1 – Physicochemical characteristics of colloidal systems (NE and NC) prepared with TTO (mean \pm S.D., represents the variation between the 3 different batches) 47

TABELA 2 – Stability studies: physicochemical characteristics of NE and NC containing TTO (1%) after 1 and 2 months of storage at room temperature and protected from light (mean \pm SD, n = 3) 47

PUBLICAÇÃO 3: Avaliação do efeito antiedematogênico tópico e na cicatrização de feridas da pele de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de óleo essencial de melaleuca

TABELA 1 – Composition of nanoemulsions and nanocapsules containing TTO.. 68

TABELA 2 – Quali-quantitative composition of hydrogels 69

TABELA 3 – pH values and spreadability factors of the hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control hydrogels (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) (mean \pm SD) 74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVO	17
1.1 Objetivo geral	17
1.2 Objetivos específicos	17
REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 Micoses superficiais	19
1.2 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	22
1.3 Sistemas nanoestruturados e antimicrobianos	27
1.4 Incorporação de nanopartículas em formas farmacêuticas de aplicação tópica	31
PUBLICAÇÃO 1: Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial: proteção frente à volatilização	35
PUBLICAÇÃO 2: Efeito de suspensões de nanocápsulas contendo óleo de melaleuca no crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	49
PUBLICAÇÃO 3: Avaliação do efeito antiedematogênico tópico e na cicatrização de feridas da pele de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de óleo essencial de melaleuca	65
DISCUSSÃO GERAL	86
CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

INTRODUÇÃO

A pele e as mucosas são barreiras mecânicas efetivas, constituindo um obstáculo à perda de água e outros materiais endógenos necessários para a sua nutrição, à permeação de substâncias externas nocivas, além de proteger o organismo contra agentes infecciosos (PINTO et al., 2011). No caso de injúrias neste órgão, torna-se possível a penetração de microrganismos, causando abscessos cutâneos e sérios problemas subcutâneos ou, ainda, dependendo do grau da lesão, estes podem acometer a circulação, levando a uma infecção generalizada (NOSKIN et al., 2005). Devido a sua importância como barreira protetora, é imprescindível a reparação quando, por algum tipo de dano ou trauma, a integridade desta é afetada, levando à formação de feridas. O processo de cicatrização é afetado pela idade, estado nutricional e neuropatia pós-ferimento, tornando, muitas vezes necessária a utilização de agentes que possam estimular o evento da cicatrização (SUMITRA; MANIKANDANA; SUGUNAB, 2005).

As dermatofitoses, também conhecidas como micoses superficiais, se encontram entre as doenças infecciosas mais comuns, sendo de distribuição cosmopolita (GARG et al., 2009). Devido a sua alta incidência, são consideradas como um importante problema de saúde pública. Os principais agentes etiológicos causadores destas infecções são os fungos dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, além de algumas leveduras como *Candida* spp. Tais fungos possuem uma predileção pela queratina da pele, pêlos e unhas, tornando estes tecidos o principal substrato para sua instalação e desenvolvimento, originando lesões que resultam da destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória (SIDRIN; ROCHA, 2004).

As onicomicoses são as infecções fúngicas com maior índice de refratoriedade de tratamento que, por requererem um longo período de terapia sistêmica, acompanhado de uma série de efeitos adversos, contra-indicações, alto custo da medicação e possibilidade de interação com outros fármacos, acabam por ocasionar a interrupção do tratamento, levando ao surgimento de casos recorrentes. O problema das taxas de recorrência das infecções já tratadas é o aumento da resistência aos antifúngicos utilizados na terapia oral, corroborando com a falta de tratamento tópico eficaz e a interação entre os fármacos, aumentando os efeitos adversos (SCHAR, 2007). Cabe salientar que, nestes casos, a administração tópica de antifúngicos é pouco utilizada, uma vez que a penetração da substância ativa é a principal dificuldade encontrada, sendo que os elementos fúngicos persistem dentro ou abaixo da placa da unha (NAKASHIMA et al., 2002). Fatores como as características físico-químicas do

fármaco (tamanho de partícula, caráter hidrofílico e lipofílico) e a natureza do veículo ao qual está incorporado se relacionam com a penetração deste através da unha (MURDAN, 2002; KOBAYASHI et al., 2004). Desta forma, a melhor alternativa para o sucesso do tratamento tópico de onicomicoses seria um produto que transpusesse e/ou permanecesse por maior tempo na superfície da unha acometida pelo agente causador da infecção (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004) e que possibilitasse a difusão transungueal do ativo a níveis que atingissem a concentração inibitória mínima frente aos agentes etiológicos (MARTY, 1995).

Devido à problemática encontrada nas terapias atuais, as quais acabam por se tornarem refratárias no combate às infecções fúngicas, é evidente a necessidade da utilização de terapias alternativas, que visam contornar a resistência microbiana aos agentes antifúngicos atuais, bem como o desenvolvimento de formulações que objetivam aumentar o grau de penetração e permanência do fármaco no local da infecção. A opção pelo tratamento tópico aponta uma grande vantagem ao ser isenta de efeitos sistêmicos adversos (EVANS; ROBERTS, 2002; NAKASCHIMA et al., 2002; MURDAN, 2002; KOBAYASHI et al., 2004; REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004).

A introdução de terapias complementares ou alternativas tem ocorrido em uma escala crescente no contexto mundial. As plantas medicinais, devido às suas variadas propriedades farmacológicas vêm ganhando um espaço importante neste cenário (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Os óleos essenciais obtidos a partir dessas plantas têm sido amplamente utilizados, principalmente no que diz respeito às terapias antifúngica e antibacteriana (BUCK; NIDORF; ADDINO, 1994; SYED et al., 1999; BURT, 2004; NASCIMENTO et al., 2007). Além disso, apresentam atividade frente ao câncer, doenças cardiovasculares e possuem atividades antioxidantes e antidiabéticas (EDRIS, 2007). Tais óleos podem ser incorporados em preparações farmacêuticas, empregados isoladamente ou em combinação com outras substâncias, visando o tratamento tópico de infecções (HARRIS, 2002). Entretanto, em virtude de sua complexidade química, volatilidade e suscetibilidade à degradação, torna-se necessário empregar procedimentos para melhorar a sua estabilidade, contribuindo para a eficácia dos produtos.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), conhecido popularmente como óleo da árvore do chá (tea tree oil), é obtido por hidrodestilação a partir das folhas da planta australiana e tem seu uso tópico difundido em virtude de suas propriedades medicinais (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), sendo a sua maior utilização como um antisséptico seguro, natural e efetivo (COX et al., 2000). É constituído de uma complexa mistura de

hidrocarbonetos, dentre os quais se sobressaem os monoterpenos, sesquiterpenos e seus alcoóis correspondentes.

Em virtude de suas propriedades medicinais, o óleo essencial de *M. alternifolia* é empregado em formulações de uso tópico, como cremes, loções, géis, soluções, sendo amplamente difundido e comercializado. Entretanto, devido as suas características físico-químicas, algumas dificuldades são encontradas para o desenvolvimento de formulações e embalagem dos produtos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

A busca por estratégias que visam melhorar as características físico-químicas de substâncias ativas leva ao encontro de inovações tecnológicas como a nanotecnologia. Nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões e outros materiais nanoestruturados são produtos de atual interesse. Estes sistemas coloidais tem sido alvo de importantes estudos no que tange à questão de aperfeiçoar a liberação de substâncias em um determinado local, atuando como um sistema carreador de fármaco e propiciando sua distribuição em locais específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, o seu emprego em formulações tópicas garante a proteção da área afetada frente à toxicidade do ativo, prevenindo ou reduzindo possíveis reações de sensibilidade. Este efeito protetor ocorre devido à diminuição do contato direto do ativo com a região alvo (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Estes sistemas conferem uma melhora nas propriedades físico-químicas de fármacos e promovem um aumento no tempo de permanência e adesividade do ativo, o que apresenta uma enorme potencialidade em sua aplicação tópica, tratando-se de locais em constante fricção por vestimentas e pelas simples atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MÜLLER et al., 2007).

Considerando a potencialidade dos sistemas nanoestruturados em aumentar a eficácia de determinadas substâncias, aliado a possibilidade de aumentar a estabilidade físico-química de alguns compostos, protegendo-os das intempéries do meio, este trabalho foi delineado no sentido de se estudar a inédita obtenção de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* e sua posterior incorporação em uma forma farmacêutica semissólida. Este trabalho foi desenvolvido a fim de promover uma maior estabilidade do óleo, aliado a possibilidade de favorecer os aspectos de direcionamento e aumento de tempo de permanência no local de ação, consistindo em uma estratégia para melhorar o tratamento de distúrbios cutâneos e infecções fúngicas superficiais, em especial onicomicoses. A incorporação destes sistemas em bases semissólidas propicia a obtenção de uma forma farmacêutica de consistência adequada para aplicação tópica.

OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo geral estudar a incorporação do óleo essencial de *M. alternifolia* em nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas, visando sua aplicação no tratamento tópico de desordens cutâneas.

1.1 Objetivos específicos

- Preparação de nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo essencial de *M. alternifolia*;
- Caracterização físico-química e avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados;
- Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos sistemas nanoestruturados frente à *Candida albicans* e em modelo de infecção ungueal causada por *Trichophyton rubrum*;
- Preparação e caracterização físico-química de formulações semissólidas (géis hidrofilicos) contendo os sistemas nanoestruturados desenvolvidos;
- Avaliação *in vivo* do efeito antiedematogênico e da atividade cicatrizante dos hidrogéis.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Micoses superficiais

O órgão responsável pela formação de uma barreira biológica capaz de conferir proteção ao organismo frente a agentes externos como substâncias químicas e microorganismos é a pele. O estrato córneo, com suas células coesas e perfeitamente justapostas é a parte responsável pela barreira à permeabilidade. O espaço extracelular da camada mais externa da barreira cutânea é preenchido com uma camada quase contínua de lipídeos. Os corpos lamelares, responsáveis pela composição lipídica são constituintes essenciais para esta função de barreira protetora (CEVC; VIERL, 2010). Disfunções na homeostasia do pH do estrato córneo, a perda de água ou a solubilização e posterior remoção de parte da sua composição lipídica podem afetar a integridade da pele (SCHREML et al., 2010). Além disso, quando lesada, é suscetível a contaminação microbiana, levando a formação de abscessos cutâneos, bem como o surgimento de infecções generalizadas (NOSKIN et al, 2005).

A unha é um apêndice da pele e também desempenha funções de proteção. Atua na importante função de gerar sensação de toque e firmeza ao segurar objetos, além de desempenhar um papel de destaque na indústria cosmética. É composta de pregas, matriz (tecido epidérmico altamente proliferativo), leito e hiponíquio, que juntas formam a placa ungueal (Figura 1). Trata-se de um apêndice cutâneo rígido cuja dureza se deve à disposição de “sanduíche” das suas fibras de queratina. É constituída, principalmente, por fibras protéicas e queratina, coladas pelas proteínas globulares que conferem adesividade entre as células ungueais (MURDAN, 2002).

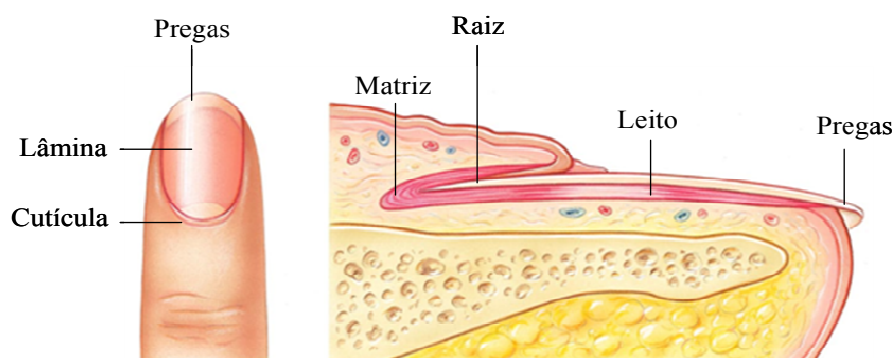


Figura 1 – Estrutura esquemática da unha. (Fonte: UACCB).

As infecções fúngicas superficiais, também conhecidas como dermatofitoses ou micoses superficiais, estão dentre as doenças infecciosas mais comuns. São causadas, principalmente, por fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Algumas leveduras, como *Candida* spp também fazem parte deste arsenal etiológico. Estes fungos produzem queratinases, sendo capazes de digerir a queratina e tomá-la como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008) o que gera o acometimento de, especialmente, tecidos altamente queratinizados, como pele, unhas e cabelo, tanto de seres humanos como de animais (SIDRIM; ROCHA, 2004; KANBE, 2008). As dermatofitoses ocorrem principalmente em tecidos com baixa vascularização ou mesmo tecidos mortos, onde a resposta imunológica não é eficiente (KANBE, 2008). Independentemente da sua localização, as infecções fúngicas superficiais são capazes de induzir respostas imunológicas (MIGNON et al., 2008). As lesões geradas nas infecções por dermatófitos normalmente são resultado da destruição da queratina, acompanhada por uma resposta inflamatória (SIDRIM; ROCHA, 2004). A secreção de proteinases com atividade ótima no pH da pele e de seus apêndices, e a capacidade de aderência conferida pela secreção de glicoproteínas pela parede celular fúngica, são fatores determinantes pela alta virulência destes agentes (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

Dentre as infecções fúngicas superficiais (*tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis*, *tinea cruris*, entre outras), as onicomicoses são as de maior relevância. Tais infecções acometem as unhas das mãos e dos pés, tornando-as quebradiças, finas, discrômicas e desfiguradas (GUNT; KASTING, 2007). O acometimento das unhas pelos dermatófitos se dá secundariamente à penetração na camada córnea da porção distal do leito ungueal. A cinética de aderência na pele ou na placa ungueal de espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* corresponde a um aumento tempo-dependente do número de esporos aderentes, seguido por germinação e invasão do estrato córneo ou das placas de queratina por hifas em múltiplas direções. Lesões ocasionadas por traumas predis põem a penetração do agente na unha (VERMOUT et al., 2008). Já a colonização por *Candida* spp ocorre a partir das bordas ungueais, seguido do acometimento do leito ungueal, fenômeno denominado paroníquia, descrevendo uma inflamação dos capilares com posterior infecção (HAY; BARAN, *in press*). Estudos indicam que a secreção de proteases, tanto pelos fungos filamentosos, quanto pela levedura, sugerem que este é uns dos principais mecanismos de aderência do patógeno no tecido (VERMOUT et al., 2008).

As micoses de unha podem ser classificadas de acordo com os sinais clínicos e alterações causadas a partir das infecções por diferentes fungos. Existem diversas classificações, entretanto, a mais completa e atual é a proposta por Hay e Baran (*in press*): *onicomicose subungueal distal e lateral* (hiperqueratose com intervalo de discromias e listras longitudinais no meio ou nas laterais da placa ungueal), *onicomicoses superficiais* (irregulares ou transversais, podendo ocorrer invasão para camadas mais profundas), *onicomicose endonyx* (o fungo atinge camadas profundas da placa da unha), *onicomicose subungueal proximal* (desigual, estriada ou secundária a paroníquia), *onicomicose totalmente distrófica* (alterações secundárias a estados avançados de outros padrões de invasão da placa ungueal, normalmente associada com casos de imunocomprometimento), *onicomicose secundária* (decorrente de outras patologias de unha).

As desordens ungueais, além de tornarem as unhas com aspecto físico prejudicado, causam dor, afetando, não só fisiologicamente, como fisicamente e também socialmente seus portadores, comprometendo a qualidade de vida. Um estudo feito por Drake e colaboradores (1999), demonstrou o impacto ocasionado pelas onicomicoses na qualidade de vida de homens e mulheres, independentemente de acometerem unhas das mãos ou dos pés. O problema se agrava devido à problemática que acompanha o tratamento destes tipos de infecções, pois além de apresentar uma alta incidência, o diagnóstico não é satisfatório, de difícil elucidação do agente etiológico, se fazendo necessária a utilização de técnicas onerosas e demoradas, como o sequenciamento genético (KANBE, 2008). Não obstante, esse tipo de infecção fúngica é a que apresenta o maior índice de refratoriedade de tratamento, pois requerem um período longo de terapia sistêmica, que acaba ocasionando interações medicamentosas sérias. Ainda, a terapia antifúngica sistêmica leva à ocorrência de inúmeros efeitos adversos e contra-indicações e apresenta potencial toxicidade sendo que, na maioria das vezes, um acompanhamento das funções hepáticas e contagem de células sanguíneas são indispensáveis (MURDAN, 2002). A soma de todos esses fatores acaba levando a um seguimento terapêutico inadequado ou ao abandono do tratamento (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Outro problema que diz respeito às micoses superficiais reside no fato de seus agentes etiológicos se tornarem resistentes à terapia utilizada (EVANS; ROBERTS, 1998). O mecanismo de resistência antifúngica pode estar relacionado a fatores como: modificações envolvendo enzimas-alvo; desenvolvimento de bomba de efluxo; possibilidade de desenvolvimento de uma resposta celular ao estresse, que ocorre quando doses subinibitórias de um antifúngico induzem às respostas celulares fisiológicas de proteção frente a determinado quimioterápico (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Ainda, a

formação de artroconídeos, resultantes da fragmentação das hifas do dermatófito, acaba contribuindo para a resistência ao tratamento (YAZDANPARAST; BARTON, 2006; FINCH; WARCHAW, 2007). Cabe salientar que a formação de artroconídeos é aumentada quando a terapia antifúngica é interrompida antes da exterminação do agente (COELHO et al., 2008).

A terapia tópica é uma boa opção de tratamento, pois é uma terapia não invasiva, na qual a substância ativa irá agir somente no local da infecção, com a abstenção dos efeitos adversos e interações medicamentosas, oferecendo, ainda, um menor custo, o que torna esse tipo de tratamento mais aceito e favorece a adesão do paciente. Entretanto, é pouco utilizada, sendo administrada concomitantemente com a terapia sistêmica. Seu uso é limitado pela baixa permeabilidade da substância ativa na placa da unha (MURDAN 2002), dificultando o acesso desta ao local da infecção, uma vez que as hifas e artroconídeos persistem entrelaçadas nas fibras de queratina ou abaixo da placa da unha, entre a placa e o leito ungueal (NAKASHIMA et al., 2002). Sendo assim, para o sucesso da terapia tópica, seria necessário um produto que fosse capaz de penetrar e/ou permanecer certo tempo na superfície da unha infectada (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004). Para isso, torna-se necessária a otimização desta terapia, lançando mão de substâncias que atinjam concentrações efetivas locais, com características físico-químicas adequadas para a permeação através da unha (tamanho de partícula, caráter hidrofílico ou lipofílico), bem como a escolha do veículo ao qual o ativo está incorporado (MURDAN 2002; KOBAYASHI et al., 2004). Sendo assim, a utilização de tecnologias que possam viabilizar o alcance da substância ativa ao agente da infecção seria de grande valia para contornar os obstáculos apresentados.

1.2 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

A busca por terapias alternativas vem tomando um espaço bastante importante no cenário da saúde. Esta procura se deve ao fato das terapias convencionais apresentarem, muitas vezes, efeitos adversos severos, além do desenvolvimento de resistência microbiana frente ao mais variados agentes antimicrobianos. Essa problemática acaba solicitando a inclusão de outros tipos de terapias, como a utilização de plantas medicinais. Os óleos essenciais advindos dessas plantas dispõem de diversas propriedades farmacológicas (HALKÓN; MILKUS, 2004; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), fazendo parte, inclusive de farmacopéias, como a Farmacopéia Européia (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Seu emprego abrange desde a utilização como aromatizante de produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos, para o tratamento de distúrbios digestivos (ação

carminativa), como analgésicos e anti-inflamatórios, até sua utilização como abortivos (CHAN, 2001), sendo que alguns óleos apresentam, ainda, propriedades sedativas, espasmolíticas e de anestesia. Embora apresentem esta vasta variedade de ações farmacológicas, sua popularidade como produto medicinal se deve à potente atividade antimicrobiana, ou seja, viricida, fungicida e bactericida (BAKKALI et al., 2008). Além disso, são mundialmente utilizados como conservantes em produtos farmacêuticos e alimentícios (BURT, 2004).

Estes óleos são formados por uma complexa mistura de metabólitos secundários voláteis, isolados, principalmente, por hidrodestilação (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010). Podem ser utilizados puros ou incorporados em formulações farmacêuticas, com ou sem a utilização de adjuvantes ativos, no sentido de complementar a medicina convencional ou até mesmo substituí-la, principalmente no que diz respeito às terapias antifúngica e antibacteriana (BUCK; NIDORF; ADDINO, 1994; SYED et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2007). Além disso, apresentam a vantagem de serem raras as manifestações de resistência ou adaptação microbiana, pelo fato de seu mecanismo de ação atingir diferentes locais da célula microbiana (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, deve-se ter cautela no que se refere à administração concomitante de antibióticos e óleos essenciais, pois dependendo do quimioterápico a ser empregado e da natureza do óleo, pode haver interações entre ambos, podendo ocorrer sinergismo ou antagonismo, prejudicando assim a terapia (VAN VUUREN et al., 2009).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) é obtido a partir da hidrodestilação das folhas da planta nativa australiana, popularmente conhecida como árvore do chá (tea tree). Embora existam outras espécies de *Melaleuca*, a nomenclatura óleo de melaleuca corresponde, exclusivamente, à espécie *M. alternifolia*, e é reconhecido e adotado oficialmente pelo *Australian Therapeutic Goods Administration* como TTO (*tea tree oil*) (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Seu uso tópico é difundido na Austrália devido as suas diversas propriedades medicinais (HARKENTHAL et al., 1999) e, inclusive, há relatos de fazer parte do *kit* militar dos australianos durante a Segunda Guerra Mundial, tamanha a sua importância. Inicialmente, foi utilizado em doenças nos pés e na assepsia de feridas, quando suas folhas esmagadas eram postas diretamente no local da lesão (HALCÓN; MILKUS, 2004; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Nas últimas décadas, ultrapassou barreiras, ganhando popularidade também na Europa e na América do Norte, onde é comercializado como medicamento para o tratamento de diversas doenças, como acne,

micoses nos pés, gengivites e como antisséptico local. As formas farmacêuticas mais utilizadas são géis, sabonetes e cremes. (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

O óleo de melaleuca é composto por monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes. A composição do óleo é regulada pelo padrão internacional (ISO 4730), o qual se refere às máximas e mínimas concentrações de cada um dos 14 componentes majoritários. Os componentes que fazem parte do padrão internacional foram escolhidos devido à linhagem e a sua atividade biológica (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). O seu principal constituinte é o terpinen-4-ol, seguido do γ -terpineno e α -terpineno (Figura 1), aos quais se atribui o amplo espectro de atividade antisséptica (CARSON; RILEY, 1995; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; OLIVA et al., 2003). Devido à vasta gama de constituintes, com diferenças sutis em relação ao seu mecanismo de ação, é difícil o desenvolvimento de resistência microbiana em relação ao óleo. Para tanto, seria necessário o desenvolvimento de numerosas mutações simultâneas para transpor as diferentes ações (HAMMER; CARSON; RILEY, 2008).

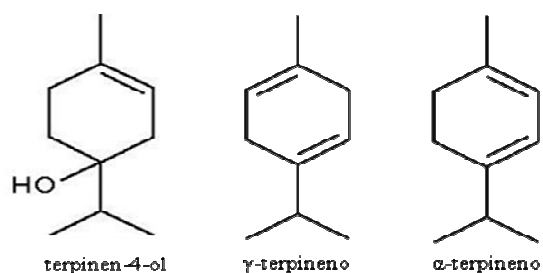


Figura 2 – Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia*.

Hart e colaboradores (2000) demonstraram o potencial de utilização do óleo essencial de melaleuca no controle tópico de reações inflamatórias, onde a aplicação do óleo sobre a pele conferiu a penetração dos componentes através da derme vascularizada, permitindo a regulação do processo inflamatório. O óleo, ainda, foi capaz de modular a vasodilatação e o extravasamento de plasma associado à inflamação induzida por histamina (KOH et al., 2002). Sua eficácia também foi averiguada na cicatrização de feridas, principalmente, naquelas que se apresentavam infeccionadas (HALCÓN; MILKUS, 2004).

Importantes estudos acerca da atividade antiproliferativa do óleo revelam sua potencialidade no tratamento de desordens celulares desse tipo. Sua atividade antitumoral foi reportada por Bozzuto e colaboradores (2011), onde provou ser capaz de inibir o crescimento de células (cultura) de melanoma resistentes e sensíveis à terapia usual, o que, posteriormente,

foi comprovado por Calcabrini e colaboradores (2004), quando testaram a atividade do componente majoritário, terpinen-4-ol, frente às células de melanoma humano resistentes. Outro experimento *in vitro* frente a células cancerosas foi descrito em 2009 por Liu e colaboradores, os quais empregaram células de carcinoma pulmonar, prostático e de mama. Ainda, sua atividade antiproliferativa foi verificada *in vivo* no tratamento de tumor subcutâneo em ratos (GREAY et al., 2010).

Sua atividade antiviral tem sido também reportada. Estudos de Garozzo e colaboradores (2009) demonstraram atividade frente ao vírus influenza, e Carson e colaboradores (2001) evidenciaram a atividade frente ao vírus do herpes labial, a partir da aplicação de gel na concentração de 6%. A atividade antiviral é devido à presença de terpenos, como demonstrou um estudo comparativo da atividade antiviral de monoterpenos de diferentes óleos essenciais (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010).

O óleo de melaleuca apresenta atividade frente a inúmeras cepas bacterianas, como *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*. A atividade frente a cepas resistentes a antibióticos desperta a atenção dos pesquisadores. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) demonstraram-se suscetíveis ao óleo, assim como aquelas resistentes à mupirocina (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Todavia, sua atividade antibacteriana pode ser comprometida pela presença inadequada de tensoativos (solubilização do óleo dentro de micelas, impedindo sua interação com o microrganismo) e substâncias orgânicas presentes nos meios de cultivo (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999). Estudos conduzidos por Carson e colaboradores (1994) demonstraram a ação do óleo frente ao *Propionibacterium acnes*, comprovando sua atividade anteriormente referenciada por Basset e colaboradores (1990), os quais compararam a ação do óleo com o peróxido de benzoíla. Da mesma forma que a substância sintética, o óleo apresentou eficácia, reduzindo o número de lesões inflamadas e não-inflamadas.

O óleo exibe uma extensa atividade antifúngica frente a cepas de *Aspergillus sp*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Cladosporium spp*, *Criptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, além de leveduras, como *Candida spp*, dermatófitos e outros fungos filamentosos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Existem estudos que evidenciam a utilização do óleo essencial de melaleuca como um potente ativo para o tratamento de diferentes infecções fúngicas. Syed e colaboradores (1999) demonstraram que a terapia tópica, durante 8 semanas com 2% de cloridrato de butenafina em conjunto com 5% de óleo essencial de melaleuca

incorporados em um creme base, foi capaz de curar as infecções fúngicas de unhas. Além disso, os autores sugerem o desenvolvimento de novas formulações, que possibilitem o aumento da penetração e da retenção do ativo antimicótico, diminuindo o tempo de tratamento, bem como a adição de substâncias capazes de aumentar a velocidade de crescimento da unha sadia. Um estudo conduzido por Buck e colaboradores (1994) demonstrou que o tratamento tópico de onicomicoses com 100% de óleo essencial de melaleuca, durante 6 meses, foi semelhante ao realizado com 1% de clotrimazol, sugerindo a utilização do óleo como tratamento alternativo para tais infecções.

Adicionalmente, alguns trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana dos componentes majoritários do óleo e os compostos terpinen-4-ol e α -terpineno apresentaram, isoladamente, atividade frente a cepas fúngicas (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003) e bacterianas (PAPADOPOULOS et al., 2006), sendo que o terpinen-4-ol demonstrou atividade bacteriostática e bactericida frente às cepas MRSA (LOUGHLIN et al., 2008). Quando isolado, o terpinen-4-ol apresentou maior atividade do que quando presente no óleo, e combinações entre terpinen-4-ol e α -terpineno demonstraram atividades antimicrobianas similares às apresentadas pelo óleo puro (COX; MANN; MARKHAM, 2001). Cabe salientar que para a manutenção da sua atividade antimicrobiana, a concentração de terpinen-4-ol no óleo deve estar acima de 30%. A proporção entre os componentes do óleo é indicativa de sua qualidade e um dos aspectos importantes se refere aos níveis de 1,8-cineol, os quais devem ser inversamente proporcionais aos de terpinen-4-ol (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Embora apresente inúmeras e bem relatadas atividades medicinais, o óleo essencial de melaleuca se destaca por suas propriedades antissépticas, principalmente frente a fungos e bactérias. Seu mecanismo de ação antimicrobiana 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 dos mesmos (COX et al., 2000; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo para sua ação bactericida varia de 0,25% a 2%, dependendo do microrganismo envolvido (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). A CIM necessária para sua ação frente aos fungos dermatófitos varia de 0,004 % a 0,25 % (HAMMER; CARSON; RILEY, 2002; BENDER et al., 2004) e para *C. albicans*, de 0,06 % a 8 % (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Devido ao seu amplo arsenal de propriedades medicinais, como atividades antifúngica (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004), antibacteriana (COX et al., 2000), anti-inflamatória (HART et al., 2000), antiviral (CARSON et al., 2008) e antiparasitária (WALTON et al., 2004), e sob o ponto de vista de segurança, o óleo essencial de melaleuca vem ganhando

espaço no cenário mundial, no que se refere ao uso tópico (REICHLING et al., 2006). A incorporação do óleo em xampus (0,5 a 1% v/v), em combinação com timol (0,8 a 1,5% v/v), resultou na importante diminuição de piolhos e subsequente morte desses parasitas (McCAGE et al., 2002). Quando utilizado em uma pomada a 5%, foi apto em reduzir a viabilidade do ácaro *Sarcoptes scabiei* (WALTON et al., 2004).

Cabe salientar que o óleo de melaleuca na sua forma pura apresenta relativa fototoxicidade e potencial alergênico no que se refere ao uso tópico (CARSON; RILEY; COOKSON, 1998). Quando incorporado em formulações, pode causar irritação dérmica e ocasionar reações alérgicas dose-dependente em indivíduos pré-dispostos; em formulações contendo 1% (v/v) de óleo não há relatos de toxicidade dérmica (HAMMER et al., 2006). Em concentrações mais elevadas, pode apresentar toxicidade, como enfatizou um estudo realizado por Rutherford e colaboradores (2007), no qual se verificou a ocorrência de dermatite de contato em 1,8% da população, nas concentrações de 5 a 10% (v/v). Os agentes sensibilizantes são, principalmente, produtos de degradação dos componentes do óleo, como peróxidos, epóxidos e endoperóxidos (HAUSEN; REICHLING; HARKENTHAL, 1999). Estes produtos são formados a partir da exposição à luz, umidade, calor e ar (HAUSEN, 2004, apud RUTHERFORD et al., 2007).

Outro aspecto importante se refere a sua incorporação em formulações de uso tópico. O óleo apresenta características lipofílicas, dificultando sua miscibilidade em produtos aquosos, e a volatilidade apresentada pelo mesmo denota a importância de sua proteção frente ao acondicionamento (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Além disso, é adsorvido em materiais plásticos, comprometendo sua estabilidade e eficácia. Desta forma, sua incorporação em formas farmacêuticas merece atenção, pois dependendo da natureza do veículo empregado, poderá ocorrer uma baixa disponibilidade de seus constituintes.

1.3 Sistemas nanoestruturados e antimicrobianos

A nanotecnologia é o ramo de uma ciência multidisciplinar que envolve engenharia, eletrônica, física e ciências dos materiais, preocupando-se com o *design*, síntese, caracterização e aplicação de ferramentas e dispositivos cujas dimensões se encontram em escala nanométrica, ou seja, 10^{-9} metros (SAHOO; LABHASETWAR, 2003; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009). Devido a sua aplicabilidade variada, que vai desde áreas como a nanomedicina, sistemas de liberação

modificada de fármacos e ativos cosméticos, até a ciência petroleira, tem-se investido largamente em pesquisas nesta área (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Sistemas coloidais, constituídos de nanoestruturas, tem sido alvo de importantes estudos na área farmacêutica no que tange a questão de aperfeiçoar a liberação de substâncias de uma forma precisa, segura e reprodutível, atuando como um sistema carreador de fármacos, capaz de exercer um controle da liberação, propiciando efeito terapêutico máximo, com o mínimo de efeitos ou reações adversas.

Dentre os principais sistemas nanoestruturados de interesse farmacêutico se encontram os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas. Os lipossomas, com suas múltiplas ou únicas camadas, são vesículas compostas basicamente de uma bicamada de fosfolípido e colesterol e são biologicamente inertes. São aptos a carrear substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas ou hidrofóbicas, visto que são constituídos por um núcleo aquoso (SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009). As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas com o intuito de obter um carreador alternativo para as emulsões. Seu núcleo pode conter lipídeos sólidos ou líquidos, ou ainda, uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos, recoberto por uma camada de fosfolídeos. Diferentes técnicas de obtenção são descritas, entretanto, a homogeneização a alta pressão é a que apresenta maiores vantagens como, por exemplo, fácil transposição de escala, isenção da utilização de solventes orgânicos e produção em curto tempo (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). As nanoemulsões são dispersões óleo/água, com suas gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos. Devido ao tamanho nanométrico de suas gotículas, fenômenos de desestabilização são impedidos por repulsão estérica entre elas (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). As nanopartículas poliméricas constituem as nanoesferas e as nanocápsulas, diferindo-se entre si na estrutura e composição. As nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos, onde o fármaco pode estar retido, ou simplesmente adsorvido na superfície. Já as nanocápsulas possuem na sua composição a presença de um núcleo oleoso, o que permite uma alta taxa de encapsulação de fármacos lipossolúveis. Este núcleo é circundado por um fino invólucro polimérico. Assim, o fármaco pode se encontrar dissolvido no núcleo, adsorvido ou disperso na parede polimérica (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Atualmente, em virtude de modificações na composição das nanocápsulas, foram reportadas nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais possuem um núcleo hidrofóbico contendo uma substância lipídica sólida, como o monoestearato de sorbitano, apresentando um núcleo mais viscoso que as nanocápsulas convencionais (JAGER et al., 2009).

Dentre os aspectos importantes que devem ser ressaltados a respeito das nanopartículas poliméricas são a melhora das propriedades físico-químicas de substâncias, proporcionando uma maior e melhor distribuição da substância ativa no local de ação e o direcionamento desta ao seu sítio específico (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Conferem, ainda, um aumento na estabilidade de substâncias, protegendo-as de fatores externos e aumentando, consideravelmente, sua meia-vida, uma vez que reduzem a suscetibilidade à degradação ao protegê-las das intempéries do meio, como luz, oxidação e hidrólise (OURIQUE et al., 2008; WEISS-ANGELI et al., 2008; FONTANA et al., 2009) ou da desnaturação frente a mudanças físico-químicas, como alterações de pH (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Estudos envolvendo a veiculação de fármacos antimicrobianos em nanopartículas poliméricas se encontram descritos na literatura. Como exemplos, pode-se citar a incorporação de antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídicos, fluorquinolonas, dentre outros, demonstrou a potencialidade desses sistemas em melhorar o índice terapêutico e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade desses quimioterápicos em relação a sua forma livre (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000). SANTOS-MAGALHÃES e colaboradores (2000) avaliaram a incorporação de penicilina G em nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões com o intuito de comparar os dois sistemas em relação à estabilidade e verificar a influência da parede polimérica no perfil de liberação deste antibiótico. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as formulações apresentaram estabilidade e perfil de liberação semelhantes. Lboutounne e colaboradores (2002) obtiveram nanocápsulas de clorexidina utilizando a PCL [poli(ϵ -caprolactona)] como polímero, demonstrando uma superior ação antimicrobiana desta formulação, em comparação com a solução do mesmo fármaco. Esta suspensão de nanocápsulas propiciou, também, uma liberação sustentada do fármaco por, pelo menos, 8 horas. Quando a rifampicina, isoniazida e pirazinamida foram associadas à nanocápsulas de PLGA [poli(ácido lático-co-glicólico)], apresentaram superior eficácia no tratamento de tuberculose em cobaias, quando comparadas ao tratamento convencional (PANDEY et al., 2003). GUPTA e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo esparfloxacino com o intuito de aumentar a tolerabilidade da formulação e o tempo de permanência ocular, aumentando a biodisponibilidade do fármaco. Estudos associando ciprofloxacino e PHEMA [poli(2-hydroxietyl metacrilato)] foram realizados a fim de avaliar a liberação do fármaco a partir das nanopartículas, demonstrando que a liberação deste diminui com o aumento da concentração do polímero (CHOUHAN; BAJPAI, 2010). O mesmo fármaco, quando associado à nanopartículas de Eudragit[®] RS100 ou mistura de

Eudragit[®] RL100/PLGA apresentou liberação prolongada e características físico-químicas satisfatórias (DILLEN et al., 2006).

Buscando melhorar suas propriedades, alguns trabalhos descrevem a associação de antifúngicos em nanopartículas poliméricas. Em 1997, Espuelas e colaboradores, associaram anfotericina B à nanoesferas de PCL, com o intuito de reduzir sua toxicidade, o que foi comprovado em ensaios *in vivo*. A incorporação de econazol em nanopartículas de PLG foi realizada por Ahmad e colaboradores (2008). Os resultados obtidos demonstraram que oito doses orais administradas em camundongos infectados, durante uma semana, apresentaram serem equipotenciais a 112 doses do fármaco livre, administradas duas vezes ao dia. AMARAL e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo anfotericina B e através dos resultados obtidos foi possível reduzir em três vezes a frequência de aplicação do fármaco, com a vantagem da isenção de toxicidade renal e hepática em comparação a sua forma livre. A inclusão do clotrimazol e econazol em nanocápsulas de PLG e alginato proporcionou um aumento da biodisponibilidade oral dessas substâncias em camundongos (PANDEY et al., 2005). Com o intuito da obtenção de uma formulação que prolongasse o tempo de contato do fluconazol na córnea, nanocápsulas de polissacarídeo (goma cordia) foram desenvolvidas por Yadav e Ahuja (2010). A incorporação de metronidazol em nanopartículas de quitosana obteve sucesso na liberação sustentada deste fármaco por um período de 12 horas (ELZATAHRY; ELDIN, 2008). Mais tarde, Saboktakin e colaboradores (2011) obtiveram uma formulação mucoadesiva, de liberação prolongada, incorporando metronidazol a nanopartículas de TCS (quitosana tiolada) associada ao PMAA [poli (ácido metacrílico)]. Ainda, um aumento na solubilidade aquosa foi verificado para a griseofulvina quando incorporada em nanocápsulas e nanoesferas de PCL (ZILI; SFAR; FESSI, 2005).

Abordagens na incorporação de óleos essenciais à nanocarreadores são, também, descritas na literatura. Silva (2005) obteve suspensões de nanocápsulas de Eudragit S100 contendo o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, as quais apresentaram tamanho de partícula de 258 nm e quando incorporadas em creme não-iônico, foram capazes de diminuir o grau de citotoxicidade do óleo em estudos *in vitro*. Lai e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas de lipídeo sólido contendo 1% de óleo essencial de *Artemisia arborenses* com aplicações voltadas para a agricultura (pesticidas ecológicos). O tamanho médio de partícula apresentou faixa nanométrica (em torno de 200 nm) e a eficiência de encapsulação foi de, aproximadamente, 90%. Estes sistemas demonstraram capacidade em reduzir a volatilização deste óleo. Lertsutthiwong e colaboradores (2008) verificaram a associação do óleo essencial

de açafrão (*Curcuma longa*) em nanocápsulas de alginato utilizando uma metodologia de múltiplas etapas. A taxa de encapsulação do óleo foi baixa em todas as condições empregadas devido à volatilidade do mesmo, gerando perdas durante todo o processo de preparação (em torno de 40%). Em outro estudo, a fim de reduzir a perda do óleo de açafrão durante o processo de obtenção de nanocápsulas, quitosana foi utilizada em combinação com alginato, obtendo uma recuperação máxima de 68,5% (LERTSUTTHIWONG; ROJSITTHISAK; NIMMANNIT, 2009). Ainda, van Vuuren e colaboradores (2010) verificaram a incorporação de três óleos essenciais em lipossomas revestidos por quitosana: *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia* e *Artemisia afra*, com taxas de encapsulação de 69,2, 41,7 e 18,7%, respectivamente. Este estudo demonstrou que a nanoencapsulação do óleo de *A. afra* não causou aumento de sua atividade antimicrobiana, ao passo que para os outros dois óleos, um aumento na atividade foi alcançado.

Da mesma forma, as nanoemulsões também foram alvo de estudos envolvendo óleos essenciais. Nanoemulsões contendo 20% do óleo essencial de citronella (*Cymbopogon nardus*) foram desenvolvidas e caracterizadas, além da avaliação *in vivo* da bioatividade como repelente de mosquitos (SAKULKU et al., 2009). Neste estudo, o método utilizado para a preparação das formulações foi o de homogeneização a alta pressão e os tamanhos obtidos variaram de 120-220 nm. A durabilidade da repelência proporcionada pelas nanoemulsões foi condizente com as características do estudo de liberação do óleo. Pela mesma metodologia, Nuchuchua e colaboradores (2009) obtiveram nanoemulsões contendo óleos essenciais de citronella, manjerição peludo (*Ocimum americanum*) e vetiver (*Vetiveria zizanioides*). Os tamanhos de partícula ficaram entre 150-160 nm e as formulações mantiveram-se estáveis durante dois meses. A ação prolongada das nanoemulsões na repelência do mosquito *Aedes aegypti* demonstrou ser inversamente proporcional ao tamanho de partícula.

Além dos óleos essenciais, estudos demonstram a incorporação de seus componentes isolados em sistemas nanoestruturados. Choi e colaboradores (2009) obtiveram nanocápsulas de eugenol, preparadas pelo método de emulsificação-difusão e inclusão molecular. O tamanho de partícula variou de 310 a 320 nm e a encapsulação foi efetiva na proteção do eugenol frente à fotodegradação. Em outro estudo, a atividade antimicrobiana de carvacrol e timol incorporados em lipossomas foi avaliada por Liolios e colaboradores (2009) e os resultados obtidos demonstraram maior atividade dos componentes quando incorporados no sistema coloidal em comparação à forma livre.

1.4 Incorporação de nanopartículas em formas farmacêuticas de aplicação tópica

A utilização de nanopartículas para o tratamento tópico de doenças torna-se uma atraente alternativa, uma vez que a liberação de substâncias diretamente no local-alvo reduz significativamente a ocorrência de efeitos adversos se comparado à administração parenteral ou oral (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Tais sistemas apresentam um reduzido tamanho de partícula, proporcionando um maior poder de cobertura pela formação de um fino filme sob a pele, facilitando o contato direto da substância com o estrato córneo, direcionando para o tratamento tópico (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004). É relevante comentar que os sistemas coloidais são capazes de modular a difusão transdérmica, alterando o coeficiente de difusão ou partição, podendo também alterar a farmacocinética e a biodistribuição do fármaco através da pele e, ainda, conferir maior adesividade da substância de interesse no local. Além disso, quando utilizados em formulações tópicas, garantem a proteção da área afetada frente à toxicidade da substância ativa, prevenindo ou reduzindo possíveis reações de sensibilidade e irritação. Este efeito protetor ocorre devido à diminuição do contato direto da substância com a região alvo (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Ainda, promovem um aumento no tempo de permanência deste, o que apresenta uma enorme potencialidade em sua aplicação tópica, tratando-se de locais em constante fricção por vestimentas e pelas simples atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). Cabe salientar que a eficácia de um produto de aplicação cutânea depende da correlação entre os coeficientes de permeabilidade no estrato córneo e as características do fármaco (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Em virtude das vantagens apresentadas pelos nanocarreadores na liberação cutânea e transepidermal de fármacos, algumas pesquisas têm direcionado para o desenvolvimento de formulações para esse fim. O tratamento de distúrbios cutâneos como eczemas, psoríase e acne tem sido alvo constante desses estudos. A inclusão de glicocorticóides, como o clobetasol (FONTANA et al., 2009), dexametasona (MARCHIORI et al., 2010), e outros anti-inflamatórios como nimesulida (ALVES et al., 2007) em nanopartículas poliméricas demonstram este interesse. Tendo em vista o tratamento da acne, retinóides como tretinoína (OURIQUE et al., 2008), isotretinoína e adapaleno, assim como outras classes de fármacos, tem sido incorporados em sistemas sub-micrométricos (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

Os produtos para uso tópico geralmente são formulados como géis ou emulsões, os quais, devido à sua consistência, apresentam características apropriadas para aplicação

cutânea (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). O veículo será o responsável pela distribuição diferencial do fármaco na pele, devido as suas propriedades físico-químicas e sua interação com a substância ativa (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Além disso, sua escolha dependerá do objetivo de aplicação do produto. Suas propriedades reológicas podem ser modificadas de acordo com os constituintes, o que refletirá diretamente no perfil de espalhabilidade do produto na pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Os hidrogéis contendo nanopartículas dispõem, ao mesmo tempo, das vantagens oferecidas por elas e dos benefícios relacionados à sua hidrofilicidade, flexibilidade, versatilidade, alta capacidade de absorção de água e biocompatibilidade do gel (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

Na preparação de géis, diferentes polímeros são utilizados para oferecer variação na textura das formulações e, assim, comportamentos diferenciados são observados. Os carbômeros são os agentes de geleificação de nanoemulsões mais estudados (SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004; MOU et al., 2008). Já os espessantes estudados para a obtenção de géis a partir de suspensões de nanopartículas poliméricas foram: Pluronic[®] F127 (MIYAZAKI et al., 2003), Satiaxane[®] CX 91, (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001), Natrosol[®] 250 M, (LUENGO et al., 2006), Carbopol[®] 940 (MILÃO; KNORST; GUTERRES, 2003; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005, ALVES et al., 2007) e Carbopol[®] Ultrez 10NF (MARCHIORI et al., 2010; ; OURIQUE et al., 2011; FONTANA, et al., *in press*).

Assim, com o relato do emprego de hidrogéis como formulações semissólidas para aplicação tópica de sistemas nanoestruturados, se torna evidente a viabilidade tecnológica da utilização dos mesmos. Neste contexto, a incorporação de nanocápsulas e nanoemulsões contendo o óleo essencial de melaleuca em bases semissólidas constitui uma abordagem inovadora, tendo em vista a inexistência de trabalhos estudando esse tipo de formulação.

PUBLICAÇÃO 1

Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial: proteção frente à volatilização

Artigo publicado no periódico Química Nova

**NANOSTRUCTURED SYSTEMS CONTAINING AN ESSENTIAL OIL:
PROTECTION AGAINST VOLATILIZATION**

Fernanda Cramer Flores, Roseane Fagundes Ribeiro, Aline Ferreira Ourique, Clarice Madalena Bueno Rolim and Cristiane de Bona da Silva*

Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Adriana Raffin Pohlmann

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Ruy Carlos Ruver Beck and Sílvia Stanisçuaski Guterres

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

* e-mail: csbona@smail.ufsm.br

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the feasibility of preparing nanocapsules and nanoemulsions using tea tree oil as oily phase aiming to protect its volatilization. The nanostructures presented nanometric mean size (160-220 nm) with a polydispersity index below 0.25 and negative zeta potential. The pH values were 6.43 ± 0.37 and 5.98 ± 0.00 for nanoemulsions and nanocapsules, respectively. The oil content after preparation was 96%. The inclusion of tea tree oil in nanocapsules showed higher protection against volatilization. The analysis of mean size and polydispersity index of formulations presented no significant alteration during the storage time.

Key words: nanoemulsions; nanocapsules; tea tree essential oil.

INTRODUCTION

The use of raw materials of plant origin in pharmaceutical products has been growing in the last years. The diversity of medicinal plants, some characterized by the presence of substances with potential pharmacological effect, contributes to several studies that aim to demonstrate the action and effectiveness of some compounds.

Essential oils, obtained from different plant species, have been promising, particularly because of their antimicrobial, insecticides and antiviral properties^{1,2} and they may be incorporated in pharmaceutical preparations for the topical treatment of skin diseases.³ However, because of their chemical complexity and susceptibility to degradation, besides volatility and insolubility in water, it is necessary to employ procedures to improve the oil stability contributing to the product's effectiveness.

One essential oil of particular interest over the last years has been the tea tree oil (TTO) obtained from leaves of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) species by a steam distillation process. TTO is popular as a topically applied product due to its known medicinal properties, particularly its antibacterial⁴⁻⁷ and antifungal activities.^{8,9} It has been used topically to treat conditions such as acne, onychomycosis, oral candidiasis, and tinea pedis.¹⁰ Additionally, TTO presents antiviral¹¹ and anti-inflammatory properties.¹²

TTO contains over 100 components, mainly monoterpenes and sesquiterpenes hydrocarbons and their associated alcohols. Its main component is terpinen-4-ol, followed by α -terpinene and γ -terpinene, which is attributed to the broad spectrum antiseptic activity.^{9,13,14} The physical characteristics of TTO present certain difficulties for the formulation and packaging of products. Its lipophilicity leads to miscibility problems in water-based products, while its volatility means that packaging must provide an adequate barrier to volatilization. Moreover, the composition of TTO may change during storage, and light, heat, exposure to air, and moisture can affect its stability.¹⁰

The TTO in its pure form presents on phototoxic and allergenic potential in relation to topical.¹⁵ When incorporated in topical formulations, can irritate skin and cause allergic reactions in a dose-dependent individuals predisposed. However, dermal toxicity is not reported in formulations containing 1% (v/v) of oil.¹⁶ The occurrence of allergic reactions and irritation is related to oxidation of the components present in the oil depending on storage conditions and packaging material used. The essential oil is absorbed in plastic, affecting thus its stability.¹⁰

Different carrier systems have been extensively studied with the aim of controlling the drug release and improving the efficacy and selectivity of drugs.^{17,18} Nanocapsules,

nanospheres, nanoemulsions, and other nanometric systems have a great surface area, which makes them suitable for important pharmaceutical and cosmetic applications, such as topical aqueous formulations of lipophilic encapsulated drugs for a homogeneous release.¹⁹ An important advantage of these systems is their small size (below 1 μm), which facilitates their formulation in dermatological products and enables comfortable application to the skin.^{19,20} Besides, the possibility of increasing the effectiveness and stability of formulations or active substances, as well as their gradual release in adequate doses are good advantages too.^{21,22}

This way, this work aims to propose a strategy to prepare nanoemulsions and polymeric nanocapsules formulations using TTO as oily phase due its interesting properties for topical application. Besides the physicochemical characteristics, we evaluated the potential of these systems to improve the TTO stability in terms of volatilization.

EXPERIMENTAL

Materials

Tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) was obtained from Laszlo Aromaterapia (Belo Horizonte, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) (Mw = 80,000) and sorbitan monooleate were acquired from Sigma (São Paulo, Brazil). Polysorbate 80 was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and were used as received.

GC analysis

The levels of the major components of TTO were determined by gas chromatography (Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais). GC-FID was carried out on a chromatograph (Varian CP3380), using a fused silica capillary column (DB5 30 m x 0.25 mm, J&W Scientific) with hydrogen carrier gas (1.8 mL min⁻¹). The temperature programming ranged from 50 (3 min.) to 160 °C at 3 °C min⁻¹ increments. The FID injector and detector temperatures were 200 °C. The oil was diluted in chloroform (0.5%) and 1 μL was injected. Identification and quantification of components was made by calculating the retention indices and normalization of the area, respectively.

Swelling Experiments

Films of poly(ϵ -caprolactone) were obtained by squeezing of a hydraulic press for 5 min at 5 Tons (Hydraulic Press P30000, Bovenau, Brazil). Each film was exactly weighed and then immersed in sufficient volume (2 mL) of TTO in different flasks (n = 3). The flasks were

closed and stored at room temperature. At predetermined time intervals (3, 5, 10, 15, 30 and 60 days), the films were pinched and TTO was removed using absorbing paper, thereafter the films were weighed again.²³

Preparation of the formulations

Our strategy to prepare NE and NC containing an essential oil using known methods (spontaneous emulsification and interfacial deposition of preformed polymer) was based on the optimization of the volume of both phases during the preparation (aqueous and organic phases). In order to avoid the steam distillation of TTO during the evaporation step, the volume of water was fixed to a minimum.

Nanoemulsions (NE) and nanocapsules suspensions (NC) were prepared (n = 3) by spontaneous emulsification¹⁹ and interfacial deposition of preformed polymer method,²⁴ respectively. Briefly, an organic phase composed of TTO (0.5 g), sorbitan monooleate (0.383 g), poly(ϵ -caprolactone) (0.25 g), and acetone (25.0 mL) was added to an aqueous solution (50.0 mL) containing polysorbate 80 (0.383 g) and kept under moderate magnetic stirring for 10 min. Then, the organic solvent was eliminated in rotary evaporator (Fisatom, São Paulo, Brazil) at 60 rpm and 30-35 °C temperature. The final volume of the formulations was fixed in 50 mL to obtain an oil concentration of 1% of oil (10 mg/mL). NE were prepared omitting the polymer. As a control, an emulsion (coarse dispersion) was prepared omitting the organic solvent and the lipophilic surfactant.

Characterization of formulations

Particle size, polydispersity indices and zeta potential analysis

The particle sizes and polydispersity indices (n = 3) were measured by photon correlation spectroscopy after adequate dilution of an aliquot of the samples in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The zeta potential values were measured using the same instrument at 25 °C, after dilution of the samples in 10 mM NaCl.

pH determination

The pH values of the NE and NC were determined directly in the samples using a calibrated potentiometer (Mettler Toledo, São Paulo, Brazil), at room temperature.

Determination of oil content

The total oil content (%) in the NE, NC and emulsion formulations was determined in triplicate by distilling 25 mL of samples for 3 h in a Clevenger's apparatus. For NC, after initial extraction, 20 mL of acetonitrile was added into extraction flask, and this solution was evaporated for 1 h more. The volume of TTO collected in the trap was weighted to calculate the oil recovered from the sample.

Morphological analyses

Morphological analyses were development by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 ExII, Centro de Microscopia – UFRGS), operating at 80kV. The samples (NE and NC) were diluted and deposited in Form-Carbon support films on specimen grid (Electron Microscopy Sciences), negatively stained with uranyl acetate solution (2% w/v) and observed at 150,000 of magnification.

Study of protection of the essential oil volatilization

The influence of the nanoencapsulation against essential oil evaporation was evaluated at 37 ± 1 °C. Samples (NE, NC and emulsion) were heated on a water-bath for 15, 30 and 60 minutes. After, the content of the essential oil was determined by hydro-distillation, distilling 25 mL of samples for 3 h in a Clevenger's apparatus (n = 3). The volume of TTO was collected and weighted to calculate the oil recovered from the sample.

Stability studies

Formulations were monitored following preparation until 2 months of storage by mean size, polydispersity, zeta potential and pH. The oil content was determined after 1 month of storage. Formulations were packaged in amber glass containers and stored at room temperature (25 °C \pm 2 °C) and protected from light.

Statistical analysis

Formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). One-way analysis of variance (ANOVA) was employed in the comparison of the experimental data, using the SigmaStat Statistical Program (Version 3.0, Jandel Scientific, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

GC analysis

TTO composition is regulated by an international standard (ISO 4730) for “Oil of *Melaleuca* – terpinen-4-ol type,” which sets maxima and/or minima for 14 components of the oil.¹⁰ The oil used in the study was analyzed and shown to contain acceptable levels of main components: terpinen-4-ol (39.4%), γ -terpinene (22.9%), α -terpinene (10.2%), 1,8-cineole (5.1%), terpinolene (3.6%), *p*-cymene (3.4%), α -pinene (3.2%) and α -terpineol (1.9%).

Swelling experiment

The objective of this experiment was to determine the possible solubilization of poly(ϵ -caprolactone) by TTO. In this case, the polymeric wall of nanocapsules could be dissolved by the oily core resulting in the formation of nanometric oily droplets (nanoemulsion) during the storage time. The results showed that the polymer weights have a small mass gain during the first three days of the experiment (9.8% in relation to the initial weight) After, the weight of polymer remained constant until the 60 days of the experiment (Figure 1), indicating that no solubilization of poly(ϵ -caprolactone) occurred by the oil. No statistical difference was observed between the polymer weights during all the time of the experiment ($p > 0.05$). This result shows that TTO and poly(ϵ -caprolactone) have low interactions at the macroscopic scale, indicating that after preparing of nanocapsules with TTO the polymeric wall will not be dissolved, maintaining the required characteristics.

Physicochemical properties of formulation

The NE and NC containing TTO appeared macroscopically homogeneous and opalescent bluish liquids. The physicochemical characteristics of the formulations are presented in Table 1. TTO-loaded nanocapsules and nanoemulsions presented nanometric mean diameters (160-220 nm) as well as polydispersity indices below 0.25 indicating an adequate homogeneity of these systems. The values obtained are in agreement with those usually reported for these systems (100-500 nm).²⁵⁻²⁷ The formulations showed acid pH (5.9-6.5) and negative zeta potentials (about -13 mV). The negative zeta potential values presented by the samples are related to the presence of polysorbate 80, presenting a negative surface density of charge due to the presence of oxygen atoms in the molecules.²⁸ Moreover, the type of oily phase used in the preparation of the colloidal systems may be influenced the values (in module) obtained.¹⁷ Ourique and co-workers reported zeta potential values of -4.45 and -5.14 for nanocapsules and nanoemulsions prepared with the capric/caprylic triglyceride mixture,

and -8.38 and -6.13 for nanocapsules and nanoemulsions containing sunflower seed oil.²⁶ TEM analysis showed homogeneous and spherical particles with similar diameters as determined by photon correlation spectroscopy (Figure 2).

The yield of oil obtained was $96.0 \pm 0.3\%$ for NE and $95.7 \pm 0.6\%$ for NC (Table 1) of the theoretical concentration, being that only 4% of the oil was lost during the preparation, probably during the evaporation of organic solvent. This explanation can be reinforced by the results obtained for the coarse emulsions prepared without the evaporation step, presenting an oil content of $99.2 \pm 0.2\%$.

Another approach to encapsulate an essential oil (turmeric oil) was studied by Lertsutthiwong and co-workers.^{29,30} They used biopolymers (alginate and chitosan-alginate) and nanocapsules were prepared in three-step procedure (emulsification, gelification, and solvent removal). The results showed that sonication was required to obtain nanocapsules with uniform size, and about 42% of the turmeric oil was lost during the preparation of alginate nanocapsules.²⁹ The addition of chitosan to the formulations led to a lower oil loss during the preparation (percentage recovery from 61.9-68.5%).³⁰ Regarding our work, the interfacial deposition of preformed polymer method was suitable and presented advantages to obtain nanocapsules and nanoemulsions containing an essential oil (TTO) due to the obtaining of uniform particle size, the oil recovery above 90% and the lesser time for the preparation (two-step procedure).

TTO as well as other essential oils have a pronounced odor that sometimes should be masked in formulations. This way, we analyzed the odor of our formulations, comparing the intensity of their odor with the pure essential oil. The odor intensity was NC < NE < emulsion < pure oil. It is important to point out that the incorporation of TTO in nanocapsules allows reducing considerably the odor of the oil. This result is in agreement with the ability of polymeric nanocapsules to mask physicochemical properties of some substances.²²

Protection of the essential oil volatilization

In this test, differences between the formulations were observed. After 60 minutes, the oil content was 30%, 33% and 54% in relation to the initial values for emulsion, NE and NC, respectively. The oil content in NC was about 67% after 30 minutes of heating; values lower than 42 and 40% were obtained for NE and emulsion, respectively (Figure 3). These results showed the potential of NC in protecting oil against evaporation, improving its stability. This protection can be attributed to the presence of the polymeric wall in the nanocapsules suspensions, avoiding the volatilization of the oil and its contact with the aqueous phase.

Thus, it can be suggest that oxidation reactions and degradation of compounds can be minimized by improving the stability and safety of TTO preparations. Moreover, NE also showed a protection against oil volatilization compared to the coarse emulsions, although this protection was lower than that observed for NC.

Stability studies

Regarding preliminary stability studies, no statistical difference was observed for the values of mean size and polydispersity index of formulations during the storage. However, an increased in zeta potential values (in module) was observed (Table 2). Schaffazick and co-workers report that the zeta potential is influenced by changes in the interface with the dispersing medium, due to the dissociation of functional groups on the surface of the particle, depending on the relaxation of the polymer chain over time.¹⁷ On the other hand, the pH values presented a decrease both NC and NE after 2 months of storage ($p \leq 0.05$). This decrease, for NE pH values, may be related to the higher contact of the essential oil with the aqueous phase leading, for hypothesis, to the degradation of some components as observed by their lesser protection against oil volatilization compared to NC. The decrease in the pH values to NC could be explained by the polymer chains relaxations, which exposes a higher number of terminal carboxylic groups.¹⁷ These results are in concordance with others works reported.³¹ Is important to relate that this reduction was minor that one unit after 1 month of storage for NC. Additionally, the oil content after 30 days storage was evaluated, and the yield obtained was above 90% for both NC and NE (Table 2). Additionally, during the stability study, the odor of the formulations remained the same for both formulations (NC and NE).

CONCLUSION

In this work, we proposed a strategy to obtain nanocapsules suspensions and nanoemulsions containing TTO due to its important pharmacological properties already reported in literature. The formulations presented good physicochemical characteristics related to their nanostructured character and adequate physicochemical stability. Moreover, the incorporation of TTO in nanocapsules protected it from evaporation, improving its stability and decreasing its pronounced odor. These results allow us to suggest the use of this strategy as a platform to prepare nanostructured systems containing essential oils. Studies are in progress to evaluate the antimicrobial activity of these systems as well as their incorporation in semisolid formulations as alternatives to topical delivery of TTO.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the financial support of CNPq-Brasília/Brazil and Rede Nanocosméticos/CNPq.

REFERENCES

1. Burt, S.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223.
2. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.
3. Harris, R.; *Int. J. Aromather.* **2002**, *12*, 83.
4. Raman, A.; Weir, U.; Bloomfield, S. F.; *Lett. Appl. Microbiol.* **1995**, *21*, 242.
5. Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J.; Bell, H.; Gustafson, J. E.; Warmington, J. R.; Wyllie, S. G.; *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 170.
6. Carson, C. F.; Mee, B. J.; Riley, T. V.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1914.
7. Halco, L.; Milkus, K.; *Am. J. Infect. Control* **2004**, *32*, 402.
8. Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *50*, 195.
9. Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 853.
10. Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V.; *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 50.
11. Schnitzeler, P.; Schön, K.; Reichling, J.; *Pharmazie*, **2001**, *56*, 343.
12. Hart, P. H.; Brand, C.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; Prager, R. H.; Finlay-Jones, J. J.; *Inflamm. Res.* **2000**, *49*, 619.
13. Carson, C. F.; Riley, T.V.; *Lett. Appl. Microbiol.* **1995**, *19*, 24.
14. Oliva, B.; Piccirilli, E.; Ceddia, T.; Pontieri, E.; Aureli, P.; Ferrini, M.; *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *37*, 185.
15. Carson, C. F.; Riley, T. V.; Cookson, B. D.; *J. Hospital Infection* **1998**, *40*, 175.
16. Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; Nielsen, J. B.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 616.
17. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
18. Ravi Kumar, M. N. V.; Kumar, N.; *Drug Develop. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 1.
19. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241.
20. Perugini, P.; Simeoni, S.; Scalia, S.; Genta, I.; Modena, T.; Conti, B.; Pavanetto, F.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *246*, 37.
21. Barratt, G. M.; *PSST* **2000**, *3*, 163.
22. Guterres, S. S.; Alves, M. P.; Pohlmann, A. R.; *Drug Target Insights* **2007**, *2*, 147.

23. Weiss-Angeli, V.; Polleto, F. S.; Zancan, L. R.; Badasso, F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *J Biom. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 80.
24. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; *EP 0274961 A1*, **1988**.
25. Friedrich, R. B.; Camponogara, M. F.; Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1131.
26. Ourique, A. F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R.; *Int. J. Pharm.* **2008**, *352*, 1.
27. Fontana, M. C.; Coradini, K.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Beck, R. C. R.; *J. Biomed. Nanotech.* **2009**, *5*, 1.
28. Marchiori, M. L.; Lubini, G.; Dalla Nora, G.; Friedrich, R. B.; Fontana, M. C.; Ourique, A. F.; Bastos, M. O.; Rigo, L. A.; Silva, C. B.; Tedesco, S. B.; Beck, R. C. R.; *Drug Develop. Ind. Pharm.* **2010**, *36*, 962.
29. Lertsutthiwong, P.; Noomun, K.; Jongaroonngamsang, N.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U.; *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 209.
30. Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U.; *Mater. Sci. Eng.* **2009**, *C 29*, 856.
31. Jager, A.; Stefani, v.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338*, 297.

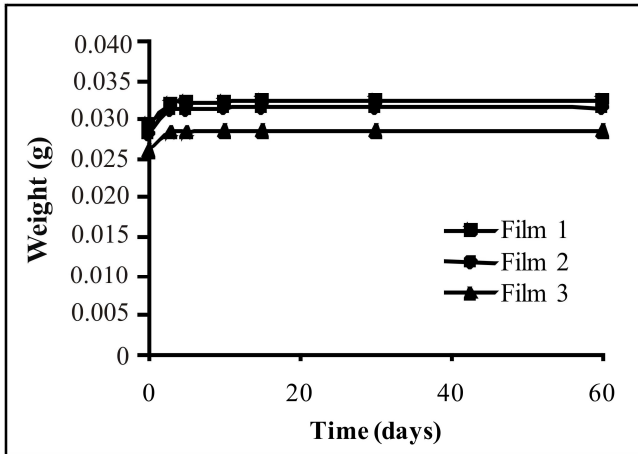


Figure 1. Swelling experiment: films weight at time intervals.

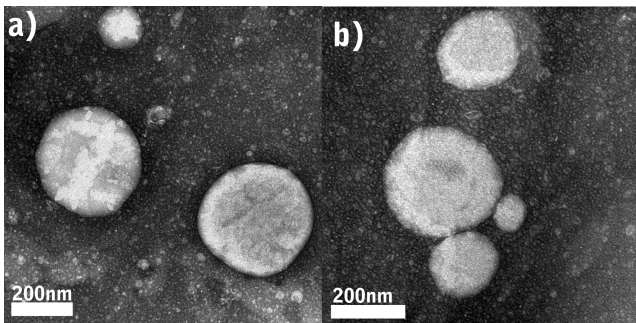


Figure 2. TEM images of NC (a) (150,000 x; bar = 200 nm) and NE (b) (150,000 x; bar = 200 nm).

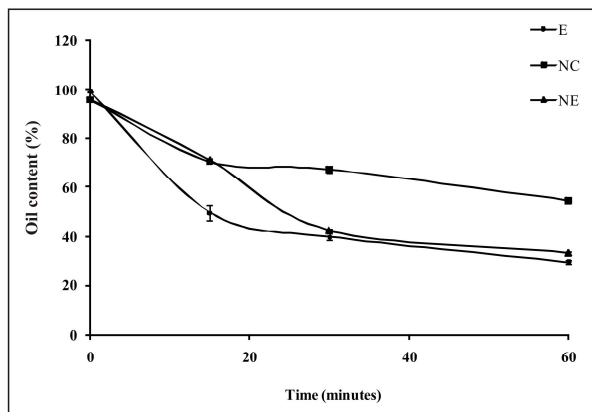


Figure 3. Oil content in the NE, NC and emulsion after heat at 37 °C, during 15, 30 and 60 minutes.

Table 1. Physicochemical characteristics of colloidal systems (NE and NC) prepared with TTO (mean \pm S.D., represents the variation between the three different batches)

Formulation	Particle size (nm)	PDI*	Zeta potential (mV)	Oil content (%)	pH
NE	167 \pm 04	0.17 \pm 0.01	-13.3 \pm 2.6	96.0 \pm 0.3	6.43 \pm 0.37
NC	212 \pm 08	0.17 \pm 0.01	-13.5 \pm 1.1	95.7 \pm 0.6	5.98 \pm 0.00

*PDI: polydispersity index.

Table 2. Stability studies: physicochemical characteristics of NE and NC containing TTO (1%) after 1 and 2 months of storage at room temperature and protected from light (mean \pm SD, n = 3)

Time (months)	Particle size (nm)	PDI*	Zeta potential (mV)	pH	Oil content (%)
NE					
1	166 \pm 07	0.17 \pm 0.03	-9.6 \pm 1.8	5.10 \pm 0.15	91.0 \pm 1.0
2	166 \pm 06	0.16 \pm 0.02	-14.6 \pm 3.8	5.01 \pm 0.10	ND
NC					
1	210 \pm 09	0.19 \pm 0.03	-12.6 \pm 2.1	5.14 \pm 0.17	90.0 \pm 0.3
2	211 \pm 05	0.17 \pm 0.02	-18.8 \pm 1.7	4.91 \pm 0.18	ND

*PDI: polydispersity index; ND: not determined.

PUBLICAÇÃO 2

Efeito de suspensões de nanocápsulas contendo óleo de melaleuca no crescimento de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*

Artigo a ser submetido para o periódico Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences

Effect of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*

Fernanda Cramer. Flores¹, Julia A. de Lima², Roseane F. Ribeiro¹, Sydney H. Alves¹, Clarice.M.B. Rolim¹, Ruy C.R. Beck³, C.B. Silva^{1,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

²Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

*Corresponding author: Cristiane de Bona da Silva

Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil
Tel: +55 55 3220-8452 Fax: +55 55 3220-8248

E-mail address: csbona@smail.ufsm.br

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the antifungal efficacy of nanocapsules and nanoemulsions containing *Melaleuca alternifolia* essential oil (TTO). The *in vitro* assay of antimicrobial activity against *Candida albicans* was done in order to obtain an inhibition profile after accompanying 0, 5, 8, 12, 24, 48 and 72 h yeast growth. In addition, the efficacy of the formulations was evaluated against *Trichophyton rubrum* in two different *in vitro* models of dermatophyte nail infection. The effect of nanostructures on the growth curve of *C. albicans* showed differences between formulations. In minor concentrations of yeast, the formulations had a significant decrease in the yeast charge that remained similar for 48 h. Moreover, the control of growth provided by the nanocapsules remained similar in all analysis times. Nail infection models demonstrated the ability of the formulations in reducing the *T. rubrum* growth, being the inclusion of oil in nanocapsules more efficient.

Keywords: *Candida albicans*; Nanoemulsions; Nanocapsules; Tea tree oil; *Trichophyton rubrum*.

INTRODUCTION

Skin and mucous membranes are effective mechanical, chemical and diffusional barriers to external environment, protecting the body against infectious agents. When this barrier is injured, the penetration of several agents like microorganisms is able to cause cutaneous and subcutaneous abscesses and depending on the degree of injury, they can affect the circulation leading to a generalized infection (1).

Dermatophytosis, also known as superficial mycosis, is among the diseases that mostly affect the world population. The main etiologic agents of these infections are dermatophytes fungi of the genera *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton* as well as some yeast such as *Candida* spp. These fungi have a predilection for the keratin of skin, hair and nails making these tissues the main substrate for the installation and development of these agents, causing injuries that result from the destruction of keratin associated with an inflammatory response (2, 3). These infections require attention, mainly in cases where the immune state is injured (3, 4) and when there is impairment of peripheral circulation (5). Onychomycoses are the superficial infections with the highest rate of treatment refractoriness, which require a long period of systemic therapy accompanied by a series of adverse effects, contraindications, high cost of medication, and the possibility of interaction with other drugs. These factors may cause the treatment interruption, and thus the incomplete recovery (2). Another reason for the treatment failure is the development of antimicrobial resistance by the strains (6). The topical therapy is underused, since transungual penetration of the active ingredient is the main difficulty because the fungal elements remain within or below the nail plate (7). Moreover, the topical formulations are easily removed due to daily activities like washing and rubbing.

Factors such as physicochemical characteristics of the nail (8, 9), the active substance (particle size, hydrophilic and lipophilic) and the nature of the vehicle to which it is embedded are related to the penetration through the nail (10, 11). Therefore, in order to have a effective eradication of etiological agents, the penetration of the active is necessary. The development of formulations with adequate physicochemical characteristics provides adequate penetration, adhering and remain in contact to nail plate. Thus, gradual and continuous release of the antifungal is obtained (10).

The essential oils obtained from aromatic plants have been widely used alone or in pharmaceutical formulations, with or without the use of adjuvants to complement conventional medicine or even replace it, especially with regard to antifungal and antibacterial

therapies (12, 13, 14). Tea tree oil (TTO) is incorporated into topical formulations due to its antibacterial, antifungal (15) and anti-inflammatory (16) properties. The essential oil obtained from leaves of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) is composed of a complex mixture of compounds, mainly monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons and their associated alcohols. Because of the wide range of constituents, the development of antimicrobial resistance is less likely to occur (17). Its use is related to the topical infections treatment, such as onychomycoses, oral candidiasis and tinea pedis. However, when incorporate in topical formulations, it can cause skin irritation and allergic reactions (18), oxidation of compounds during storage (17).

In the last years, the nanoencapsulation of active substances has been extensively studied. Different nanocarrier systems, such as liposomes, nanoemulsions, lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles have been obtained. These systems present advantages such as improve drug efficacy, drug bioavailability, reduction of adverse effects (toxicity and irritation) or drug stability increase (19, 20). Polymeric nanoparticles are solid colloidal particles classified by nanospheres and nanocapsules according to their composition. These systems are made of polymers and in the case of nanocapsules, an oil is included in order to obtain a vesicular structure (21). Due to their small particle size ($< 1 \mu\text{m}$), polymeric nanoparticles present advantageous when applied into skin, conferring higher and better distribution of the active substance into action site and an increase in adhesiveness in the case of local with constant friction by clothing and by the simple daily activities (19).

The incorporation of TTO in nanoemulsions and polymeric nanocapsules has been studied by our research group, and an oil protection against volatilization was obtained, especially to nanocapsule suspensions. The formulations showed adequate physicochemical characteristics (22). Therefore, this study was designed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of nanoemulsions and nanocapsule suspensions containing TTO against *C. albicans*, and the onychomycosis model against *T. rubrum*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) was obtained from Laszlo Aromaterapia (Belo Horizonte, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) ($M_w = 80,000$) and sorbitan monooleate were acquired from Sigma (São Paulo, Brazil). Polysorbate 80 was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and were used as received.

Candida albicans ATCC 10231 was gently supplied by Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). *Trichophyton rubrum* (clinical isolate) strains were kindly supplied by Mycological Research Laboratory (Department of Microbiology and Parasitology, UFSM, Santa Maria, Brazil).

Preparation of nanoemulsion and nanocapsule suspensions

Nanoemulsions (TTO-NE) and nanocapsules (TTO-NC) containing TTO (10.0 mg mL⁻¹) were prepared by spontaneous emulsification (23) and interfacial deposition of preformed polymer (24) methods, respectively, as previously described (22). In order to compare the oil effectiveness, formulations without essential oil were also prepared and named C-NE and C-NC (samples containing the components of the nanoemulsions and nanocapsules, respectively). Additionally, an emulsion containing free TTO (coarse dispersion, named E) was also prepared.

Effect of nanostructures on the growth of *Candida albicans*

A strain of *C. albicans* was cultured on a sabouraud-dextrose agar medium (SDA, Merck) at 25 °C for 48 h. The cells were harvested into saline solution and adjusted to yield suspensions at 1.6 x 10⁷ CFU mL⁻¹. An aliquot of 2.5 mL of each formulation (TTO-NE, TTO-NC, C-NE and C-NC) was placed into sterile tubes containing sabouraud-dextrose broth (SDB, Merck) and separately inoculated with the yeast suspension to give a final concentration at 10³-10⁴, and 10⁵ CFU mL⁻¹. The quantity used of TTO-NE and TTO-NC formulations corresponded to 2.5 mg mL⁻¹ of oil. The samples were incubated at 37 °C, and after a contact time of 0, 5, 8, 12, 24, 48 and 72 h, serial dilutions of each sample (200 µl) were prepared in saline solution. Cell viability at different times was determined by the count plate method in SDA after 72 h at 25 °C. Plates with 10-100 colonies were used for CFU counts. Results were expressed in log CFU mL⁻¹.

In vitro* efficacy of TTO-NE and TTO-NC against *Trichophyton rubrum

Experiment 1

The experiment followed a modified model of nail infection proposed by Schaller and co-workers (25). A strain of *T. rubrum* was cultured on a potato-dextrose agar (PDA, Oxoid) at 25 °C for 7 days, and a conidial suspension of the dermatophyte was prepared in sterile saline solution containing 0.01% (w/v) polysorbate 80, adjusted to a concentration of approximately 10⁵ CFU mL⁻¹. Human nail fragments were donated by healthy male and

female volunteers (without receiving any antifungal treatment for at least 6 months before the experiment). The nails were polished with a metal in order to obtain a nail powder. Sterile nail powder was put into a 96-well plate (4 mg for each well) and remained in contact with *T. rubrum* (about 10^2 CFU mL⁻¹) at 30 ± 3 °C for 1 h. After, an aliquot of 100 µl of RPMI medium (Gibco) was added in each well and the plate was incubated at 30 ± 3 °C for 5 days. After this period, the nail powder infected was treated with formulations (100 µl – TTO-NE, TTO-NC and E) or respective controls (samples without essential oil – C-NE and C-NC, 100 µl). The quantity of oil used was equivalent to MIC described to the *T. rubrum* (Carson et al, 2006). After 0 (initial of treatment), 7 and 14 days, the nail powder was removed and washed three times with RPMI medium (centrifugation at 2000 rpm) and diluted into RPMI medium. Cell viability was determined by the plate count method in SDA and CFU was counted after 7 days at 30 ± 3 °C. Analyses were performed in duplicate and results were expressed in log CFU mL⁻¹

Experiment 2

In order to simulate an onychomycosis model, we used the experiment proposed by Yang and co-workers (26), replacing the hulls by human nails. A suspension of *T. rubrum* at approximately 10^5 CFU mL⁻¹ was inoculated at SDA (1%, v/v). Blocks of this culture (about 3 mm of area) were removed and used in this experiment. Fingernail fragments from a healthy woman volunteers (without receiving any antifungal treatment for at least 6 months and without using nail lacquer for 1 month before experiment) were used. Fragments were sterilized and separately placed in sterile Petri dishes with their external face on filter paper (3 cm) soaked with the formulations or with sterile water as control. Air humidity maintenance was maintained with the aid of another larger plate (9 cm) containing 4 mL of sterile water. The agar block of dermatophyte was placed on the internal face of nail fragments, moistened with SDB every other day, and incubated at 30 ± 3 °C for 8 days. The samples (40 µL – TTO-NE, TTO-NC, C-NE, C-NC and E) were applied on the filter paper every two days for six days. Sterile saline solution was used as a negative control. At the end of 8 days, the size of the mycelium was measured with a digital paquimeter (Starrret).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). One-way analysis of variance (ANOVA) was employed in the comparison of the experimental data at a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

In previous works we reported the feasibility to prepare nanoemulsions and polymeric nanocapsules containing TTO (TTO-NE and TTO-NC, respectively). These formulations showed nanometric mean size (160-220 nm) with a polydispersity index below 0.25. The inclusion of TTO in nanocapsules showed higher protection against volatilization (22). In the present work we evaluated the effect of the nanostructured system on the growth of two strains of microorganisms of clinical importance. This study also allowed a first assessment of the antifungal activity of nanostructured systems in a model of onychomycosis.

Effect of nanostructures on the growth *Candida albicans*

Results obtained in the evaluation of antifungal activity of TTO-NE and TTO-NC against *C. albicans* are showed in Figures 1 and 2. When the initial concentration of microorganism was close to $3.7 \log \text{CFU mL}^{-1}$, the formulations showed to be able to reduce, approximately 1.5 units log, and maintain this value until 48 h. No statistical difference was obtained between the formulations ($p > 0.01$). After the time incubation of 72 h, an increase on the growth of yeast near the initial was observed for TTO-NE ($2.8 \pm 0.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ at 48 h to $3.1 \pm 0.2 \log \text{CFU mL}^{-1}$). The same was not observed for TTO-NC. However, considering the initial concentration of $5 \log \text{CFU mL}^{-1}$ (Figure 2), the TTO-NE did not demonstrate the same efficacy, since it was not able to reduce the number of cells. After 24 h of incubation, a significant increase (about 1.0 unit log) was observed ($p < 0.05$). On the other hand, a reduction on the growth and maintenance of values was observed for the TTO-NC during all experiment. Moreover, this sample was able to reduce nearly 0.5 units log in relation to initial *C. albicans* concentration, while TTO-NE demonstrated an increase of 0.5 unit log of this value. The components present in the formulations (C-NE and C-NC formulations) showed no interference on the microorganism growth in the concentrations used, and the values obtained were similar to the yeast growth (culture medium without the samples). Also, an emulsion (coarse emulsion – E) was tested and showed total inhibition growth in the first 5 h of the experiment.

Nanostructured formulations were also evaluated employing a higher oil concentration (5.0 mg mL^{-1}) near its MIC against *C. albicans* (17), and a total inhibition of yeast was also verified after 5 h.

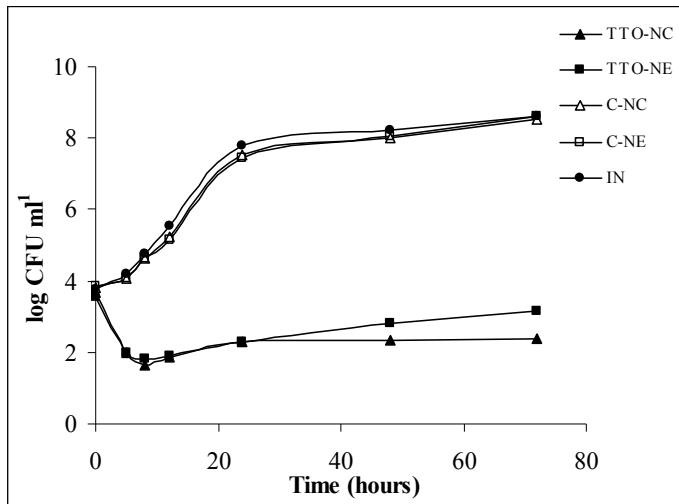


Figure 1. Microbiological efficacy of formulations against *C. albicans* (yeast suspension at 10^3 - 10^4 CFU mL⁻¹) (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; control nanocapsules – C-NC; control nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN).

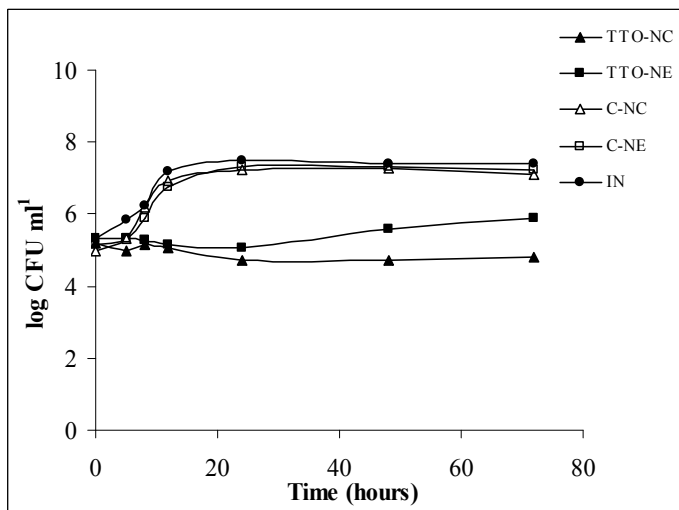


Figure 2. Microbiological efficacy of formulations against *C. albicans* (yeast suspension at 10^5 CFU mL⁻¹) (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; control nanocapsules – C-NC; control nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN).

The effect of nanostructures on the growth curve of *C. albicans* showed that the incorporation of the oil at nanostructured systems did not cause a loss in the antifungal activity as a function of time. This study can clearly demonstrate that the two developed formulations have a different performance. In minor concentrations of yeast, TTO-NE and

TTO-NC had a significant decrease in the yeast charge that remained similar for 48 h. Moreover, the control of growth provided by the TTO-NC remained similar in all analysis times, which cannot be observed for the TTO-NE due to a marked difference in maintaining control at the last point. In another test, we increased the *C. albicans* concentration and differences between the colloidal systems were observed in the first 24 h of incubation. TTO-NC significantly reduced the initial charge showing a control on the yeast growth during all the experiment.

Differences presented by the formulations studied are related to their composition and structure type. Polymeric nanocapsules present in their composition an oily core surrounded by a polymeric wall (19), and nanoemulsions, which are non-polymeric carriers, are fine oil-in-water (o/w) dispersions (27). More recently we reported that the inclusion of oil in polymeric nanocapsules allowed a higher oil protection against the evaporation, probably due to the presence of the polymeric wall (22). Thus, the oil could not be totally available to exert its inhibitory effect due to its slow release into the environment. This observation corroborates with some release studies. Fontana and co-workers (28) evaluated the release profiles of clobetasol propionate loaded-nanocapsules, nanospheres and nanoemulsions, and concluded that the type of system has influence on the drug release, and the presence of the polymer plays an important role controlling such release. In another study, the same effect was obtained for indomethacin-loaded nanocapsules in comparison with nanoemulsions (29). Differences between TTO-NC and TTO-NE in controlling the *C. albicans* growth may be due to differences in the release profile of the essential oil from these formulations, and in the case of TTO-NC, the presence of the polymeric wall was able to control its inhibitory effect for longer time. Also, comparing the results obtained between the colloidal systems (TTO-NC and TTO-NE) and conventional emulsion (E formulation), a greater activity was observed for the latter, probably due to the oil availability in this sample.

Effect of nanostructures against *Trichophyton rubrum*

Another goal of this work was to evaluate the influence of TTO-NE and TTO-NC on the growth of dermatophyte fungus thus two nail infection models were proposed.

The results obtained in the Experiment 1 are showed in Figure 3. Nanostructures (TTO-NE and TTO-NC) and conventional emulsions (E) showed activity against *T. rubrum* and differences between formulations were observed. All formulations presented a significant decrease in cell count in the first week after the initial period of treatment (2.37, 1.45 and 1.0 log CFU mL⁻¹ for E, TTO-NE, and TTO-NC, respectively). Nevertheless, only TTO-NC was

able to reduce the initial charge count (inoculum charge) to 1.0 log CFU mL⁻¹. At the end of 14 days, a significant increase ($p < 0.05$) in cell viability was observed (0.5 and 1.3 units log to TTO-NE and E, respectively) while TTO-NC presented a slight increase (0.12 units log).

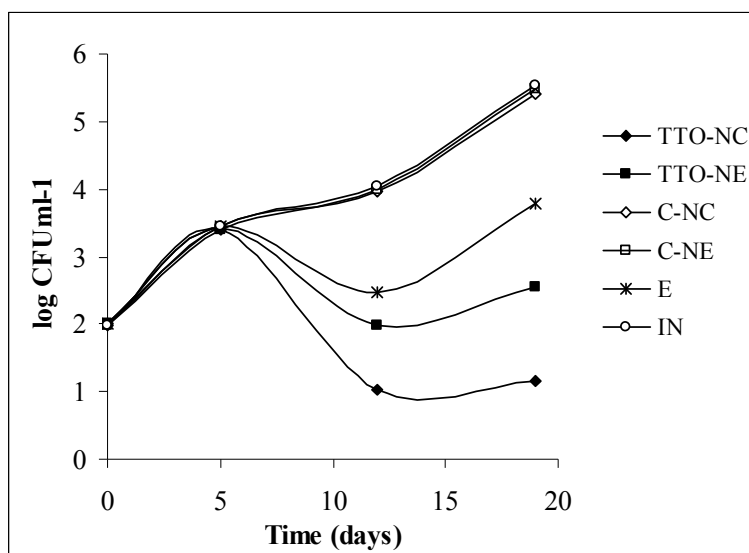


Figure 3. Effect of nanostructures against *Trichophyton rubrum* in an *in vitro* human nail infection model (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; control nanocapsules – C-NC; control nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN).

In a second experiment, an onychomycosis model with human nails was used in order to evaluate the effect of nanostructures in a similar *in vivo* condition. The nail infection was confirmed by microscopic analysis. After the period used to promote the infection, the micellar growth of *T. rubrum* was evaluated by the areas measured by different treatments and plotted in a graph (Figure 4). The areas obtained were: 2.88 ± 2.08 ; 14.59 ± 2.01 ; 40.98 ± 2.76 ; 31.97 ± 3.30 ; 39.22 ± 5.21 and 38.72 ± 1.22 , for TTO-NC, TTO-NE, E, C-NC, C-NE and nail not-treated, respectively. From the results, we observed that the nails treated with TTO-NC showed a minimum growth of the fungi, while those that were applied with TTO-NE had a considerable, but not total inhibition. Still, coarse emulsion (E) presented poor inhibition of dermatophyte growth. The control formulations (C-NC and C-NE) showed no activity and no statistical difference ($p < 0.05$) was observed in comparison with the fragments that received no treatment (IN).

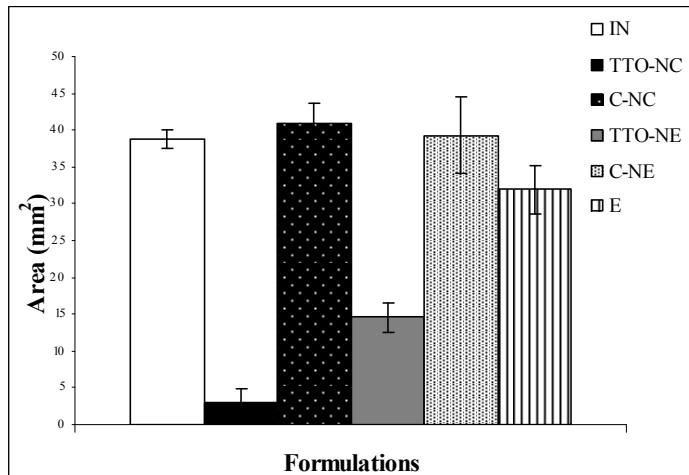


Figure 4. Effect of nanostructures against *T. rubrum* in an *in vitro* onychomycosis experimental model (nanocapsules containing TTO – TTO-NC; nanoemulsions containing TTO – TTO-NE; control nanocapsules – C-NC; control nanoemulsions – C-NE; and medium without the samples – IN).

From the experiments with human nails, we observed interesting results and differences between the formulations in relation to oil inclusion in nanocapsules and nanoemulsions. The tests employed with human nails (powders or fragments) enabled the fungus to develop in its favorite habitat. The nanostructured systems were more able to reduce the growth of the fungus in comparison with the conventional emulsion. Moreover, TTO-NC showed higher antifungal activity in contrast to TTO-NE and coarse emulsion (E), in all tests. These results support earlier findings that describe the importance of the nanoparticles to improve the effectiveness of substances.

Paulo and co-workers (30) evaluated the antifungal activity of nanoparticles containing amphotericin B and satisfactory results were obtained for the nanostructures. The larger contact area provided by these systems has promoted greater contact of the active substance with fungal membrane ergosterol. In addition, interactions of colloidal systems with the membranes of microorganisms (31) could promote a continuous diffusion of the drug into the membrane (32). Due to their small size, nanostructures can deposit a greater number of particles in the surface, exposing a higher amount of active substance (33). Thus, the increased efficacy showed by polymeric nanocapsules may be explained by the tendency that the polymers have to adsorb at the interface due to steric and electrostatic mechanisms and their hydrophobic and surface properties (32). This adsorption has just directed the drug to specific structures of microorganisms (34). Our results are in agreement with other studies

which have been conducted proving the increased efficacy when antimicrobial drugs are associated with these systems. Also, nanostructured systems were able to improve bioavailability and reduction of frequency of administrations (36).

In topical therapy of onychomycosis, another important aspect refers to the difficulty of drugs to penetrate in the nail plate, not reaching the hyphae that remain between the scales of the nail (26). Thus, low concentrations of drugs are obtained. Nail plates are composed mainly of keratin and have different thicknesses in the fingers and toes of the human body. The molecular size is an important parameter which influences the drug transport into and through the nail plate (10). Moreover, Gunt and Kasting (35) showed that the nail hydration improved the permeation of poorly water soluble drugs. Thus, the use of an aqueous formulation provides hydration of keratin, causing its expansion and formation of larger pores, facilitating the permeation of substances (10).

Melaleuca alternifolia essential oil has a broad antimicrobial spectrum, including yeasts and filamentous fungi, such as *C. albicans* and *T. rubrum*. Nanocapsules containing TTO developed by our research group could overcome some obstacles in the topical therapy of superficial mycoses, since they are aqueous suspensions with small particle size, and the presence of the polymeric wall prevents the oil volatilization, increasing its effectiveness probably due to the better penetration into the fungal cells and better delivery of oil to its site of action.

CONCLUSION

According to the results obtained in this work, nanocapsules containing *M. alternifolia* essential oil were the most efficient formulations in reducing and keeping the growth of *C. albicans* and *T. rubrum*. Another advantage of this system was to prevent nail infection caused by *T. rubrum* in an *in vitro* onychomycosis model, showing the potential of nanoencapsulation of TTO in treating superficial mycoses.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to CNPq-Brasília/Brazil by financial support.

REFERENCES

1. Noskin GA, Rubin RR, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Smulders M, Lapentina E, Gemmen E. The burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Hospitals in the United States. Archives of Internal Medicine, 2005; 165(15): 1756-1761.
2. Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G., Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Guanabara Koogan S.A., Copyright, Rio de Janeiro, RJ, 2004.
3. Degreef H. Clinical Forms of dermatophytosis (Ringworm Infection). Mycopathologia, 2008; 166: 257-265.
4. Khengar RH, Jones SA, Turner RB, Forbes B, Brown MB. Nail swelling as a Pre-formulation Screen for the Selection and Optimisation of Ungual Penetration Enhancers. Pharmaceutical Research, 2007; 24(12): 2207-2212.
5. Repka MA, Mididoddi PK, Stodghill SP. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. International Journal of Pharmaceutics, 2004; 282: 95-106.
6. Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. Mycopathologia, 2008; 166:369-383.
7. Nakashima T, Nozawa A, Ito T, Majima T. Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail with dermatophyte *in vitro*. Journal of Infect Chemotherapy, 2002; 8: 331-335.
8. Marty J-PL. Amorolfine nail laquer: a novel formulation. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 1995; 4(1): 17-21.
9. Baran R, Tosti A, Hartmane I, Altmeyer P, Hercogova J, Koudelkova V, Rozicka T, Combemale P, Mikazans I. An innovative water-soluble biopolymer improves efficacy of ciclopirox nail lacquer in the management of onychomycosis. Journal of European Academy of Dermatology and Venereology, 2009; 23: 773-781.
10. Murdan S. Drug delivery to the nail following topical application. International Journal of Pharmaceutics, 2002; 236: 1- 26.
11. Kobayashi Y, Komatsu T, Sumi M, Numajiri S, Miyamoto M, Kobayashi K, Morimoto Y. *In vitro* permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004; 21: 471-477.
12. Buck SD, Nidore DM, Addino JG. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. Journal of Family Practice, 1994; 38(6): 601-605.
13. Syed TA, Qureshi ZA, Ali SM, Ahmad SA. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. Topical Medicine and International Health, 1999; 4(4): 284-287.
14. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Júnior AMB, Trindade RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2007; 17 (10): 108-113.
15. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaormar M. Biological effects of essential oils- A review. Food and Chemical toxicology, 2008; 46: 446-475.

16. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 2000; 49: 619-626.
17. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006; 19(1): 50-62.
18. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*, 2006; 44: 616-625.
19. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2007; 2: 147-157.
20. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2010; 6: 9-24.
21. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 385: 113-142.
22. Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Pohlmann AR, Beck RCR, Guterres SS, Rolim CMB, Silva CB. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quimica Nova*, 2011; 34: 968-972.
23. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 280: 241-251.
24. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J-Ph, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989; 55(1): R1-R4.
25. Schaller M, Borelli C, Berger U, Walker B, Schimdt S, Weindl G, Jäckels A. Susceptibility testing of alomorfine, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an *in vitro* model of dermatophyte nail infection. *Medical Mycology*, 2009; 47: 753-758.
26. Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*, 1999; 148: 79-82.
27. Anton N, Benoit J-P, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. *Journal of Controlled Release*, 2008; 128: 185-199.
28. Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2009; 5: 1-10.
29. Poletto FS, Jäger E, Cruz L, Pohlmann AR, Guterres SS. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering*, 2008; 28: 472-478.
30. Paulo CSO, Vidal M, Ferreira LS. Antifungal Nanoparticles and Surfaces. *Biomacromolecules*, 2010; 11: 2810-2817.

31. Muralimohan A, Eun Ye-Jin, Bhattacharyya B, Weibel DB. Dissecting microbiological systems using materials science. *Trends in Microbiology*, 2009; 17(3) 100-108.
32. Lboutounne H, Chaulet J F, Ploton C, Falson F, Pirola P. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a Digluconate. *Journal of Controlled Release*, 2002; 82: 319-334.
33. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles- an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2008; 9: 035004 (7pp).
34. Nhung DTT, Freydiere AM, Constant H, Falson F, Pirot F. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex®). *International Journal of Pharmaceutics*, 2007; 334: 166–172.
35. Gunt H, Kasting GB. Effect of hydration on the permeation of ketonazole through human nail plate *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007; 32: 254-260.
36. Ranjita S, Loaye AS, Khalil M. Present study of Nanoparticle Research for Treatment of Tuberculosis. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2011; 4(1): 100-116.

PUBLICAÇÃO 3

Avaliação do efeito antiedematogênico tópico e na cicatrização de feridas da pele de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de óleo essencial de melaleuca

Artigo em redação

Evaluation of the antiedematogenic effect and skin wound healing of hydrogels containing polymeric nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil

ABSTRACT

Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) were developed and their physicochemical characteristics were evaluated. Their *in vivo* efficacy in protecting induced UVB skin damage and receding wound area was also investigated. Hydrogels showed adequate physicochemical characteristics such as homogeneous aspect and pH values between 5.4-5.7. The presence of nanocapsules and nanoemulsions in hydrogels did not change their spreadability. The *in vivo* antiedematogenic effect was evaluated by ear thickness measurement after UVB-irradiation and demonstrated protection conferred by hydrogels containing both nanocapsules and nanoemulsions. In addition, the hydrogel containing nanocapsules (HG-TTO-NC) presented a higher reduction of the wound area compared to the hydrogel containing nanoemulsions (HG-TTO-NE) and hydrogel containing allantoin (positive control). Analyses of the oxidative stress showed increased glutathione, vitamin C and catalase levels after the treatment with HG-TTO-NC. Results obtained in this study show the feasibility of obtained dermatological formulations containing the tea tree oil associated in nanostructured systems. These formulations represent a promising approach to topical treatment of inflammatory disorders and wound healing.

Keywords: Antiedematogenic effect; hydrogels; nanocapsules; tea tree oil; wound healing.

INTRODUCTION

The skin is an important protection organ forming a barrier against water loss and other endogenous materials as well as against the permeation of harmful external substances such as chemicals, while protecting the body against infectious agents (PINTO et al., 2011). In the case of injuries in this body, it makes possible the penetration of microorganisms causing cutaneous, subcutaneous or serious abscesses and, depending on the degree of injury, they may affect the circulation leading to a generalized infection (NOSKIN et al., 2005). All injuries, due to their importance, should be immediately repaired, which often occurs through the healing process. This repair process is composed of 3 steps. Firstly, an inflammatory process initiates and protects the area from microorganisms through the migration of immune cells to the wound area. Then, the production of reactive oxygen species (ROS) occurs. Secondly, we have the proliferative phase, where a reepithelialization occurs with the formation of a new granulation tissue and angiogenesis to cover the wound area. Finally, a remodulation with subsequent maturation of the new tissue occurs (KONDO, 2007; SCHÄFER; WERNER, 2008).

The use of alternative therapies such as natural products becomes useful due to their several medicinal properties. *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil – TTO) has topical use spread in Australia due to its various medicinal properties (HARKENTHAL et al., 1999). Its properties include antimicrobial, anti-inflammatory and antiproliferative properties (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). However, there are many problems related to TTO formulations such as oxidation of the oil components, possibility of incompatibility and adsorption in some packaging materials (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), as well as low instability when incorporated in conventional emulsions occurring phase separation, coalescence or flocculation (KIM et al., 2009). Moreover, the essential oil in its pure form presents phototoxicity and potential allergen in relation to topical use (CARSON; RILEY; COOKSON, 1998). When incorporated in topical formulations it can cause skin irritation and allergic reactions (HAMMER et al., 2006).

The incorporation of active substances in colloidal systems has been studied in order to improve the release, control of release, bioavailability, reduction of toxicity and irritation (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). These systems also protect the substance of external degradation like photodegradation (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009), oxidation, hydrolysis and pH changes (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Polymeric (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; MARCHIORI et al., 2010), lipid nanoparticles (MÜLLER et al., 2007; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009), and

nanoemulsions (ALVES et al., 2007) have been studied, particularly, for dermal application. These nanocarriers are promising for drug administration to the skin for cosmetic and pharmaceutical formulations due to their small particles ($< 1 \mu\text{m}$), greater coverage of the stratum corneum, as well as increase and improvement of the penetration of the active through skin (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

Products of skin care are usually gels or emulsions due to their ability to control the viscosity in order to offer suitable features for topical application (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). When nanoparticles are incorporated into a hydrogel, the final formulation (nanogel) offers the benefits of hydrophilicity, flexibility, versatility, high capacity for water absorption and biocompatibility of the gel as well as all the advantages conferred by nanoparticles (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Different polymers are used to obtain semisolid dosage forms with adequate consistency for cutaneous administration. Literature has reported the use of hydroxyethylcellulose (LUENGO et al., 2006), Carbopol[®] 940 (MILÃO; KNORST; GUTERRES, 2003; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005, ALVES et al., 2007), Carbopol[®] Ultrez (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA, 2010) based gel formulations for polymeric nanocapsules and nanoemulsions.

In previous works, we developed nanostructured systems (nanocapsule suspensions and nanoemulsions) containing TTO with adequate physicochemical characteristics (FLORES et al., 2011). Thus, the objective of the present study was to evaluate the feasibility of the development of hydrogels containing TTO-nanocapsules and TTO-nanoemulsions and the efficacy of these formulations to protect skin against UVB radiation and to heal the cutaneous wound.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) was obtained from Laszlo Aromaterapia (Belo Horizonte, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) ($M_w = 80,000$) and sorbitan monooleate were acquired from Sigma (São Paulo, Brazil). Polysorbate 80 was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Polymer Carbopol[®] Ultrez was acquired from Deg (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and used as received.

Preparation of nanoemulsions and nanocapsule suspensions

Nanoemulsions (TTO-NE) and nanocapsules (TTO-NC) containing *M. alternifolia* essential oil (TTO, 10.0 mg/mL) were prepared by spontaneous emulsification (BOUCHEMAL et al., 2004) and interfacial deposition of preformed polymer (FESSI et al., 1989) methods, respectively, according to the quali-quantitative composition describe in Table 1. After the dilution of the components, the organic phase was added to an aqueous solution under moderate stirring (10 min). Then, the organic solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the final volume of the formulations was fixed at 50 mL. TTO-NC suspensions were prepared using the same protocol described above, differing regarding the presence of a polymer [poly(ϵ -caprolactone)] in the organic phase. Formulations without TTO were also prepared as a control, and named C-NE and C-NC (samples containing the components of the nanoemulsions and nanocapsules, respectively).

Table 1. Composition of nanoemulsions and nanocapsules containing TTO

Phase	Components	Amount
Organic	Poly(ϵ -caprolactone)	250 mg
	Sorbitan monooleate	383 mg
	Tea tree oil	500 mg
	Acetone	25 mL
Aqueous	Polysorbate 80	383 mg
	Ultra pure water	50 mL

Preparation of hydrogels

In order to obtain hydrogel formulations, Carbopol[®] Ultrez 10 NF (acrylic acid polymer) was dispersed in aqueous nanoemulsions or nanocapsules recently prepared resulting in an oil content of 1% (w/w). Hydrogels were prepared in triplicate with a mortar and pestle, and in order to obtain an adequate semisolid formulation, all dispersions were neutralized with triethanolamine. Additionally, a hydrogel containing free TTO at the same concentration and respective control (hydrogel without oil) were made. In this case, the oil was previously dispersed in polysorbate 80 and then incorporated in a hydrogel base (Carbopol[®] Ultrez, water and triethanolamine). The semisolid formulations are: HG-TTO-NC,

HG-TTO-NE and HG-TTO (hydrogels containing TTO-NC, TTO-NE and free TTO, respectively); HG-C-NC, HG-C-NE and HG (hydrogels containing C-NC, C-NE and hydrogel without oil, respectively). The composition of hydrogels is showed in Table 2.

Table 2. Quali-quantitative composition of hydrogels

Component	HG-TTO-NC	HG-TTO-NE	HG-TTO	HG-C-NC	HG-C-NE	HG
Carbopol [®] Ultrez	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
Triethanolamine	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.05 g
TTO	-	-	0.5 g	-	-	-
Polysorbate 80	-	-	0.383 g	-	-	0.383 g
TTO-NC	q.s. 50 g	-	-	-	-	-
TTO-NE	-	q.s. 50 g	-	-	-	-
C-NC	-	-	-	q.s. 50 g	-	-
C-NE	-	-	-	-	q.s. 50 g	-
Distilled water	-	-	q.s. 50 g	-	-	q.s. 50 g

q.s., quantity sufficient.

Physicochemical characterization of hydrogels

All hydrogel formulations were characterized after 48 h of preparation in relation to macroscopic aspect, pH and spreadability.

Macroscopic analysis and pH determination

The macroscopic characteristics of hydrogels were observed in relation to aspect, odor and color. The pH values were determined after dispersion of the hydrogel in ultrapure water (10% w/v) using a calibrated potentiometer (Mettler Toledo, São Paulo, Brazil), at room temperature. The analyses were performed in triplicate for all batches.

Spreadability of hydrogels

The spreadability of semisolid formulations was evaluated according to the parallel plate method (BORGHETTI; KNORST, 2006). The sample was introduced in a central hole (1 cm) of a mold glass plate. The mold plate was carefully removed and the sample was

pressed subsequently with glass plates of known weights, with intervals of 1 min between each plate. Spreading areas reached by samples between every addition of a glass plate were measured in millimeters in vertical and horizontal axes. Analyses were made at room temperature. Results were expressed in terms of spreading area as a function of the applied mass according to Equation 1 and represent the mean of three determinations:

$$S_i = d^2 \cdot \pi / 4 \quad (1)$$

in which S_i is the spreading area (mm^2) after the application of a determined mass i (g) and d is the mean diameter (mm) reached by each sample.

The spreading area was plotted against the plate weights to obtain the spreading profiles.

Antiedematogenic effect of hydrogels induced by UVB radiation

Animals and experimental protocol

The present study was conducted in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals (ZIMMERMANN, 1983) and all procedures were approved by our Institutional Ethics Committee (number 94/2010, UFSM). The number of animals and stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatments. The behavioral evaluation was performed blindly with respect to treatment administration. All experiments were performed using adult male Swiss mice weighing 25-30 g. Animals were housed under controlled temperature (22 ± 1 °C), on a 12 h light/12 h dark cycle, with standard lab chow and water *ad libitum*. The animals were acclimated to the experimental room for at least 1 h before the experiments. Randomly chosen animals were divided into groups of 6 and topically treated on the ear surface with 0.06 g of hydrogels with nanostructures (HG-TTO-NC and HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). The formulations were applied 1 h before irradiation of the ear surface and also 4 h after irradiation as previously described (VICENTINI et al., 2010). An untreated irradiated control group was also included in the experiment.

Irradiation

The UVB source of irradiation consisted of a Philips TL40W/12 RS lamp (Medical-Eindhoven, Holand) mounted 20 cm above the table on which the mice were placed. The lamp emitted a continuous light spectrum between 270 and 400 nm with a peak emission at 313 nm. UVB output (80 % of the total UV irradiation) was measured using a model IL-1700 radiometer (International Light, USA; calibrated by IL service staff) with a sensor for UV (SED005) and UVB (SED240). The UVB irradiation rate was 0.27 mW/cm² and the dose used was 0.5 J/cm².

Edema formation

Edema was expressed as an increase in ear thickness and was recorded in mm. Ear thickness was measured before and 24 h after UVB irradiation using a digital micrometer (Starret Series 734) in animals anesthetized with halothane. The micrometer was applied near the tip of the ear distal to the cartilaginous ridges.

Effect of hydrogels in wound healing in rats

Animals and experimental protocol

Male albino Wistar rats (250-300g) were kept on clean, sterile, metal cages; one animal per cage. Food and water were provided *ad libitum* to the animals in a room with standard conditions of temperature (22-23 °C), in 12 h-light/dark cycles with lights on at 7:00 a.m. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources [number 93/2010(2), UFSM].

The animals were divided into seven groups with seven animals per group: control group (treated with HG), positive control group (hydrogel containing allantoin at 1% – HG-AL) and five test groups (hydrogels containing nanostructures – HG-TTO-NC and HG-TTO-NE, and their respective controls – HG-C-NC and HG-C-NE, and free oil – HG-TTO).

Morphometry of wound areas

This assay was performed according to the methodology described by Suguna and co-workers (2002) with slight modifications. Animals were anesthetized with xilazine (20 mg/kg

b.w. I.M.) and ketamine (100 mg/kg b.w. I.M.) and their dorsal surface was shaved and disinfected with ethanol 70% (v/v). A full thickness open excision wound of 4 cm² was made on the shaved area by removing a patch of skin. The wound sites were treated twice daily for 5 consecutive days with topical application of the hydrogels (0.5 g). The wound areas were determined on days 1, 3 and 6, by taking photographs at 25 cm and tracing the wound surface onto a transparency paper. The measuring of the surface area was calculated using AutoCAD[®] 2007. Results were converted at perceptual (%) area of days 3 and 6 compared to the first day. The general aspect of the wound area was also evaluated.

Biochemical analyses

After scarification of the animals, a patch of skin was removed, weighted and homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 15 min and the supernatants used for biochemical analysis. Catalase (CAT) activity in skin tissue was quantified spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of cell homogenate (pH 7, 25 °C) at 240 nm, for 120 s. The enzymatic activity was expressed as μmol H₂O₂/min/g tissue. Reduced glutathione (GSH) levels tissue content was determined after reaction with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). The yellow color developed was read at 412 nm, in accordance with Boyne and Ellman (1972), after modifications (Jacques-Silva et al., 2001). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of GSH in tissue samples, expressed as mmol GSH/g tissue. Plasma vitamin C (VIT C) was estimated as described by Galley and co-workers (1996) with some modifications (Jacques-Silva et al., 2001). This method produces an orange chromogen by the reaction with dinitrophenylhydrazine at 37 °C, measured in spectrophotometer at 520 nm. A standard curve using ascorbic acid was used to calculate the content of VIT C and the results were expressed as mg VIT C/mL plasma.

Statistical analysis

All formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean ± SD (standard deviation). Data were analyzed by One-way ANOVA and Tukey's test, at a significance level of 5%. For the antiedematogenic assay the results were expressed as mean ± S.E.M (standard error) and the data were analyzed followed by Duncan's Post Hoc

test when appropriated, at a significance level of 1%. For healing experiment the Statistica software was performed and the data were analysed at a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, hydrogels were prepared with nanoemulsions and nanocapsules containing TTO in order to circumvent the difficulties reported to the inclusion of the essential oil in topical preparations, especially in water-based vehicles. In addition, the maintenance and improvement of their pharmacological properties were also verified. The nanostructures were characterized by oil content, mean particle size and polydispersity as described previously by Flores and co-workers (2011). They presented satisfactory characteristics such as nanometric mean size (below 250 nm), polydispersity index below 0.25, negative zeta potential and oil content at 96%. Carbopol[®] Ultrez, an acrylic acid hydrogel, was selected due to its widely use in pharmaceutical preparations.

Characterization of hydrogels

When TTO-NC and TTO-NE were incorporated in the hydrogels, the semisolid formulations (HG-TTO-NC and HG-TTO-NE) presented satisfactory organoleptic characteristics such as brilliant and homogenous aspect and white color, similar to gel-cream formulation and odor characteristic of oil, but less intense compared to hydrogel with free oil (HG-TTO). In the case of free oil formulation we observed a homogeneous aspect and whitish color. The same characteristics were obtained from the control formulations (HG-C-NC and HG-C-NE) regarding odor. Hydrogels without nanostructures or TTO (HG) presented a transparent and homogeneous aspect.

All formulations presented pH values around 5.4 to 5.7 (Table 3), in agreement with pH values for topical application (SCHREML et al., 2010). pH values were independent of the type of formulation ($p \leq 0.05$). It is important to highlight that the hydrogels showed pH values compatible with topical application, whose epidermis is slightly acidic (KIM et al., 2006). Changes in skin pH can lead to loss of cutaneous integrity, making the skin susceptible to entry of external agents (SCHREML et al., 2010).

Table 3. pH values and spreadability of the hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control hydrogels (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) (mean \pm SD)

Formulations	pH values	Spreadability (mm ²)
HG-TTO-NC	5.43 \pm 0.05 ^a	3832.28 ^{a,c}
HG-TTO-NE	5.49 \pm 0.03 ^a	4129.82 ^{a,c}
HG-TTO	5.46 \pm 0.07 ^a	1918.86 ^b
HG-C-NC	5.38 \pm 0.34 ^a	2723.56 ^{b,c}
HG-C-NE	5.29 \pm 0.14 ^a	3204.49 ^c
HG	5.66 \pm 0.09 ^a	4778.89 ^a

*Means, in column, with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$).

During the development of semisolid formulations the knowledge of how the formulation is spread on the skin as well the strength required for its application is highly important. The efficacy of topical therapy depends on the patient spreading the formulation in the skin to deliver an adequate dose of the drug. These parameters are evaluated in spreadability studies. In this work, we used the parallel plate method for the evaluation of spreadability of hydrogels, which is the most commonly used to regulate and quantify of the applicability of semisolid preparations (GARG et al., 2002). Spreading areas and weights were plotted in graphic to obtain the spreading profiles as shown in Figure 1. The graphic representation showed that TTO-nanostructures did not influence hydrogel profile. The incorporation of TTO-NC and TTO-NE led to a slight decrease in the spreadability compared to HG. The spreading area for the same force applied was higher for HG followed by HG-TTO-NE, HG-TTO-NC, HG-C-NE, HG-C-NC and the lowest was for HG-TTO (Table 3). However, no statistical difference was obtained for hydrogels containing nanostructures and hydrogel base ($p > 0.05$). Similar results were described by other works (ALMEIDA, 2010; MARCHIORI et al., 2010). On the other hand, the hydrogel containing free oil (HG-TTO) presented the lowest spreadability ($p \leq 0.05$), demonstrating that this formulation need a higher force to be spread. Thus, hydrogels containing the nanocarrier have advantages, especially when applied in regions hurt and painful as it spreads more easily.

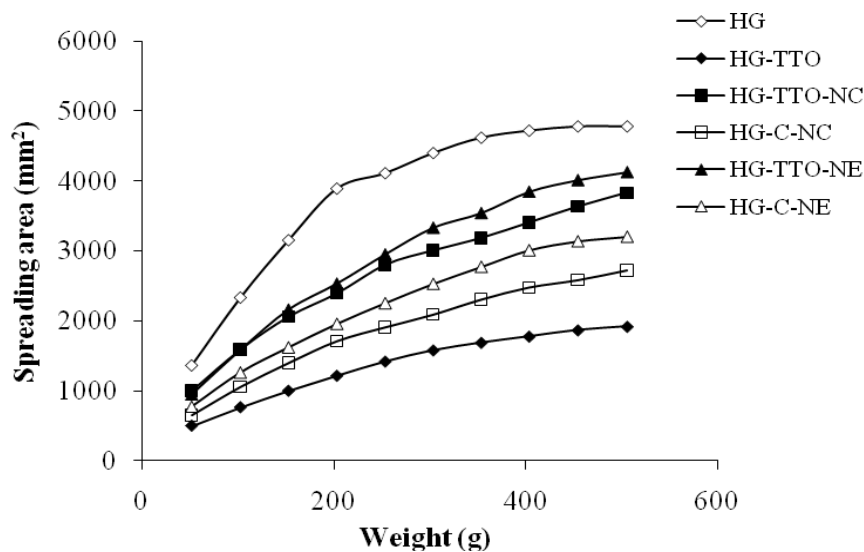


Figure 1 – Spreadability of hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free TTO (HG-TTO) and control hydrogels (HG-C-NC, HG-C-NE and HG).

Antiedematogenic effect of hydrogels induced by UVB radiation

The effect of hydrogels containing TTO in the anti-inflammatory response to skin damage was evaluated. Animals were pre-treated topically with hydrogels and the protective effect against UVB radiation was observed. Formulations were applied 1 h before and 4 h after the UVB-irradiation on the mouse ear. Edema was measured 24 h after the ear irradiation and the results were expressed as the change in ear thickness. Hydrogels containing TTO-NC and TTO-NE (HG-TTO-NC and HG-TTO-NE) were able to reduce significantly the ear edema after the exposition of the UVB radiation (Figure 2). A reduction of, approximately, 67% was obtained for HG-TTO-NC and HG-TTO-NE in relation to the untreated group. On the other hand, neither hydrogels containing free oil (HG-TTO) nor formulations without oil (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) reduced the ear thickness induced by light UVB.

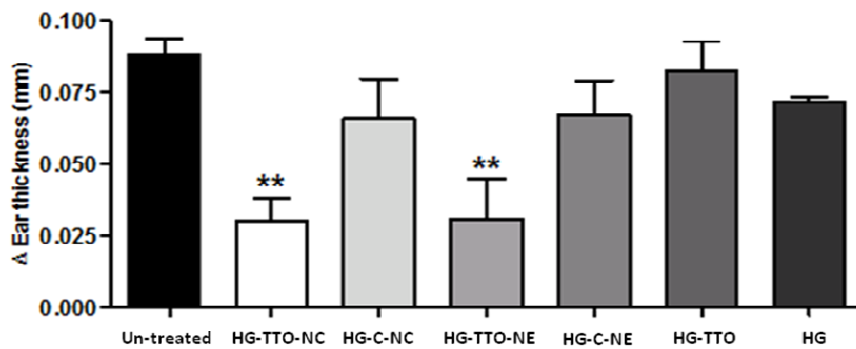


Figure 2. Effect of hydrogels on the edematogenic responses induced by UVB radiation (0.5 J/cm²). Hydrogels containing nanocapsules and nanomulsions (HG-TTO-NC and HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). Each column represents the mean S.E.M. for 6 animals (** $p \leq 0.01$ vs. un-treated mice).

Several studies have investigated the anti-inflammatory properties of TTO. Hart and co-workers (2000) evaluated the anti-inflammatory activity of the oil using human monocytes activated and they suggest that its activity is due to the suppression of inflammatory mediators, such as TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-10 and PGE₂. Moreover, the most important suppressor was terpinen-4-ol, the principal component of oil. However, this substance was not able to suppress the production of superoxide by human neutrophils (BRAND et al., 2001). Another study evaluated the topical action of TTO in skin inflammation induced by histamine and a good anti-inflammatory effect was observed (KOH et al., 2002). The anti-inflammatory effect of TTO induced by light UVB was studied by Brand and co-workers (2002). The oil was able to reduce the edema and other reactions caused by specific immune response (involving T cells), but not the influx of inflammatory cells. Still, it was ineffective in controlling the edema associated with non-specific inflammation response induced by UVB radiation. The authors suggest that these results may be due to the interaction between oil components and UVB radiation.

Our results showed that the inclusion of TTO in the nanocapsules and nanoemulsions allowed to reduce the edema induced by UVB exposure, unlike free oil formulation, where this effect was not observed. In order to explain the effect exerted by nanostructures, two hypotheses may be considered: first, the protector effect against volatilization (FLORES et al., 2011) and second, the protection afforded by nanostructures against UV light so that the oil does not degrade, thereby maintaining its components able to exert its anti-inflammatory activity. This hypothesis is reinforced with other studies reported in the literature (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009).

Effect of hydrogels in wound healing in rats

Wound healing processes consist of three steps: firstly, inflammation (action of immunological system cells); secondly, the proliferative phase (reepithelialization with angiogenesis to have a new granulation tissue) and thirdly, remodeling (novel tissue maturation) (KONDO, 2007). In order to evaluate healing action of hydrogels containing TTO-NE and TTO-NC, we investigated the regression of the cutaneous lesion in rats, in relation to basal (day 1 of wound) after the cutaneous treatment with developed hydrogels. The size of the wound area and percentage of contraction in rats were monitored during the experimental period (6 days) to assess the wound healing potential of the hydrogels. In addition, antioxidant defenses (reduced glutathione – GSH and vitamin C levels and CAT activity) were evaluated in the rat lesion after the treatment. As a positive control, a hydrogel containing allantoin (HG-AL) was used. In order to discard any possible healing action of the components used in the preparation of the nanostructured systems, hydrogels containing these substances were also prepared (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). A hydrogel containing free oil (HG-TTO) was also evaluated to compare with the nanostructures.

The regression of the cutaneous lesions when the formulations were applied in the wounds of the animals is shown in Figure 3. The results obtained showed that the hydrogel containing TTO-NC (HG-TTO-NC) was more efficient in the treatment of wound healing ($p \leq 0.05$). All formulations containing TTO presented a significant difference in relation to hydrogel base (HG). In comparison with the positive control (HG-AL), the group treated with HG-TTO-NC showed difference in wound area reduction, whereas no statistical difference ($p > 0.05$) was obtained to the group treated with the hydrogel containing free oil (HG-TTO). Although the formulation HG-TTO-NE has shown some activity, it differs statistically from the hydrogels containing the free oil and the oil included in the nanocapsules ($p \leq 0.05$).

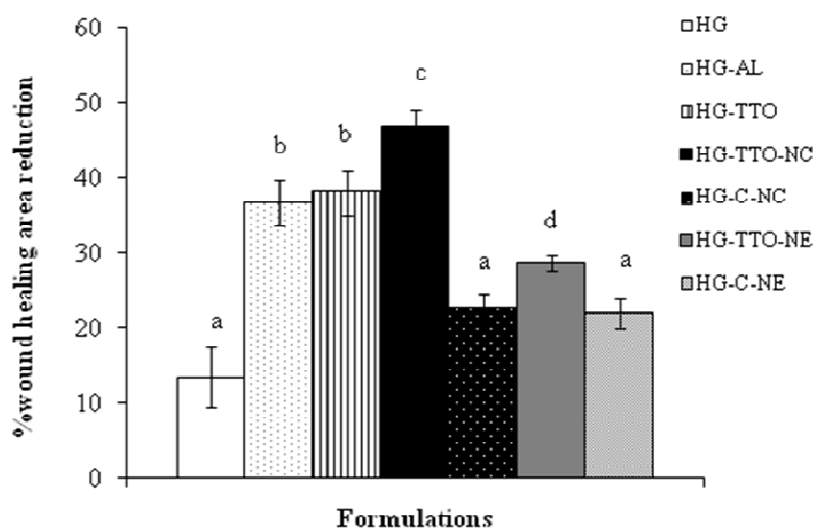


Figure 3. Percentage of wound healing area reduction in relation to basal. Hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG). Data are shown by mean \pm S.E.M (n = 6).

In order to obtain a better understanding of the healing process of the oil incorporated in our formulations, different antioxidant defenses were studied in the wound tissues after the different treatments. During inflammatory stage of the wound healing, the immunologic cells secrete ROS which play an important role in angiogenesis and are a defensive mechanism against micro-organisms. However, when they are in excess, these substances are aggressive resulting in oxidation of cellular macromolecules, causing cell damage with severe consequences like impairment in wound healing (SCHÄFER; WERNER, 2008). Thus, the determination of antioxidant status can contribute to evaluate the progress of wound healing. The results of antioxidant quantification (GSH, vitamin C and CAT) are shown in Figure 4. Levels of GSH, vitamin C and CAT obtained were, respectively: $4.02 \pm 0.30 \mu\text{mol/g}$, $178.20 \pm 5.15 \mu\text{g/g}$ and $420.67 \pm 48.44 \mu\text{mol/g}$ for the HG-TTO-NC; $3.36 \pm 0.27 \mu\text{mol/g}$, $168.5 \pm 1.86 \mu\text{g/g}$ and $310.46 \pm 45.41 \mu\text{mol/g}$ for the HG-TTO-NE; $3.17 \pm 0.51 \mu\text{mol/g}$, $141.87 \pm 8.34 \mu\text{g/g}$ and $296.13 \pm 33.53 \mu\text{mol/g}$ for the HG-TTO. According to our results, groups treated with HG-TTO-NC presented higher GSH levels and CAT activity when compared to the groups treated with other hydrogels ($p \leq 0.05$). There was no statistical difference between the groups treated with hydrogels containing free oil, TTO-NE and all control formulations. On the other hand, higher vitamin C levels were observed for the group treated with HG-TTO-NC and HG-TTO-NE compared to all other groups ($p \leq 0.05$). These results are in agreement with

the importance of antioxidant defenses in decreasing the damage of cells caused by free radicals, which contributes to the wound healing processes (SCHÄFER; WERNER, 2008), corroborating with the higher activity demonstrated by the hydrogel containing TTO-NC.

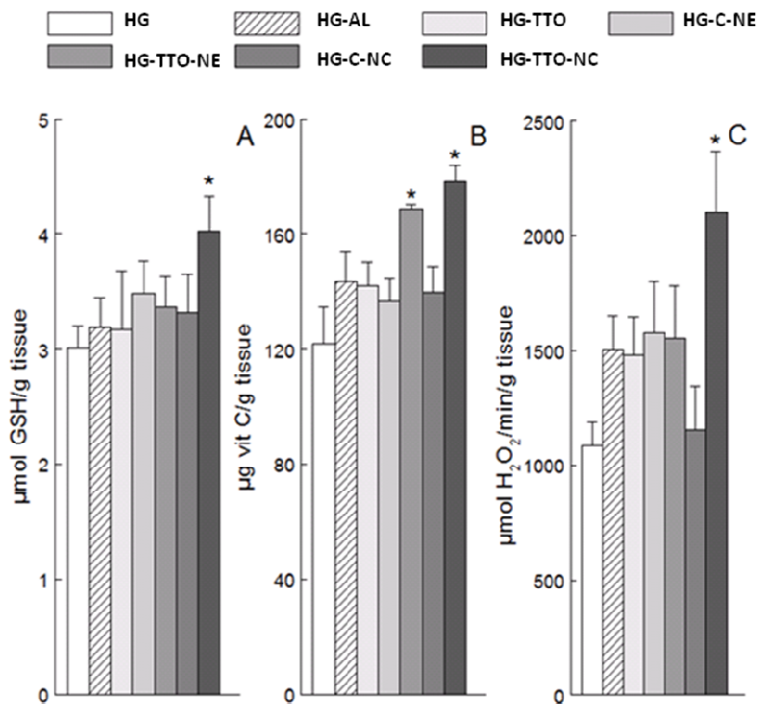


Figure 4. Effect of hydrogels containing TTO-NC (HG-TTO-NC), TTO-NE (HG-TTO-NE), free oil (HG-TTO) and control formulations (HG-C-NC, HG-C-NE and HG) in dosage of antioxidants of the cutaneous lesions in rats. (A) glutathione levels, (B) vitamin C levels and (C) catalase activity.

In this work, hydrogels containing the nanostructured systems showed both protective effects against UVB radiation (suggesting an anti-inflammatory activity) and in wound healing. According to the phases of healing, these results seem to be controversial, mainly considering the first stage of healing when the inflammatory process occurs. Studies have demonstrated that TTO anti-inflammatory responses may control the tissue damage (KOH et al., 2002), which can favor repair process. Studies performed by Kocaa and co-workers (2009) and Süntar and co-workers (2010) found the same double activity for *Centaurea iberica* and *Hypericum perforatum* extracts, respectively. These effects are due to the presence of anti-inflammatory compounds like terpenes concomitantly with antioxidants (KOCAA et al., 2009) and the possibility of shorten the inflammatory period, which contributes to protect the wound against infections and preserving this area (SÜNTAR et al., 2010), decreasing ROS levels and tissue damage.

Moreover, in order to have a tissue satisfactory repair, the wound should be free of microorganism and in some cases the use of antiseptic agents is needed (KONDO, 2007). Studies appoint to the use of TTO in wound healing, mainly in those colonized by *Staphylococcus aureus* (HALKÓN; MILKUS, 2004; EDMONDSON et al., 2011). Thus, by hypothesis, the best effect attributed to hydrogels containing TTO-nanocapsules is due to better antimicrobial activity observed in this system in comparison with TTO-nanoemulsions according with researches carried out by our group (data not shown). In addition, the lowest effect observed to the hydrogel containing the free oil (HG-TTO) may be also related to the loss of oil content caused by the volatilization, leaving less oil to exert its anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities, which are important processes involved during the wound healing. This hypothesis is based on the protection of oil afforded by nanocapsules (FLORES et al., 2011).

CONCLUSION

This work showed the feasibility to prepare semisolid formulations containing *M. alternifolia* essential oil (TTO) associated in nanoemulsions and polymeric nanocapsules. The hydrogels presented satisfactory characteristics compatible to topical application. Regarding *in vivo* studies, this work presented a bioassay to evaluate the antiedematogenic effect and wound healing study after topical application of these innovative hydrogels. Formulations were able to increase the biological activities of oil and protect the skin damage induced by UVB radiation. In addition, a higher effect on wound healing was observed to the hydrogel containing TTO-nanocapsules, showing the important role of this nanocarrier to improve the efficacy of volatile substances.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to CNPq-Brasília/Brazil by financial support.

REFERENCES

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALMEIDA, J.S. Formulações nanoestruturadas contendo rutina: desenvolvimento, atividade antioxidante *in vitro* e efeito sobre a cicatrização cutânea, 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, n. 60, p. 900-904, 2005.
- ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.
- BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.4, P. 531-537,2006.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. ; Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2080, p. 241-251, 2004.
- 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. **Inflammation Research** v. 50, 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. **Inflammation Research**, v. 51, p. 236-244, 2002.
- 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, 2006.
- CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; COOKSON, B.D. Efficacy and safety of treatment of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 175-178, 1998.
- EDMONDSON, M.; NEWALL, N.; CARVILLE, K.; SMITH, J.; RILEY, T.V.; CARSON, C.F. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. **International Wound Journal**, v.8, n.4, p. 375-384, 2011.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; 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.

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

FONTANA, M.C.; Nanopartículas contendo propionato de clobetasol: preparação, caracterização e incorporação em hidrogéis, 2010. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 1–10, 2009.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84–105, 2002.

GUTERRES, S.S., ALVES, M.P., POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALCÓN, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of Tea Tree Oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 402-408, 2004.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.616–625, 2006.

HARKENTHAL, M.; REICHLING, J.; GEISS, H.K.; SALLER R. Comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manika oil, kanuka oil and eucalyptus oil. **Pharmazie**, v. 54, p. 460-463, 1999.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; PRAGER, R.H.; FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619-626, 2000.

KIM, M-K.; CHOI, S-Y.; BYUN, H-J.; HUH, C-H.; PARK, K-C.; PATEL, R.A.; SHINN, A.H.; YOUN, S-W. Evaluation of gender difference in skin type and pH. **Journal of Dermatological Science**, v. 41, p. 153—156, 2006.

KIM, S.; NG, W.K.; SHEN, S.; DONG, Y.; TAN, R.B.H. Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/the essential oil of *Melaleuca alternifolia*/water microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 348, p. 289-297, 2009.

KOCAA, U.; PES, I.; SUNTARA, I.; KELESB, H.; YESILADAC, E.; AKKOL, E.K. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 551–556, 2009.

KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea Tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **British Journal of Dermatology**, v. 147, p. 1212-1217, 2002.

KONDO, T. Timing of skin wounds. **Legal Medicine**, v. 9, p. 109–114, 2007.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. **Protein** measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUENGO, J.; WEISSB.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K.H; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 190-197, 2006.

MARCHIORI, M.L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R.B. ; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L.A.; SILVA, C.B.; TEDESCO, S.B.; BECK, R.C.R. Hydrogel containing dexametasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962-971, 2010.

MILAN, A.L.K.; MILÃO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 649-657, 2007

MILÃO, D.; KNORST, M.T.; GUTERRES, S.S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physic-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325- 329, 2003.

MISHRA, B.; PATEL, B.B; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p. 9–24, 2010.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A. PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 522- 530, 2007.

NOSKIN, G.A.; RUBIN, R. R; SCHENTAG, J.J.; KLUYTMANS, J.; HEDBLUM, E.C.; SMULDERS, M.; LAPENTINA, E.; GEMMEN, E. The burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Hospitals in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 15, p. 1756-1761, 2005.

OHKAWA, H., OHISHI, H., YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1–4, 2008.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366 p. 170-184, 2009.

PINTO, P.; ROSADO, C.; PARREIRÃO, C.; RODREIGUES, L.M. Any barrier impairment in sensitive skin? A quantitative analysis of sensitive skin by mathematical modeling of transepidermal water loss desorption curves. **Skin Research and Technology**, v. 17, p. 181–185, 2011.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, M.S.; PANDA, M.S. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 165–171, 2008.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R-M.; KARRER, S.; HEINLIN, J.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, p. 373–378, 2010.

SUGUNA, L.; SINGH, S.; SIVAKUMAR, P.; SAMPATH, P.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p. 227–231, 2002

SÜNTAR, I.P.; AKKOL, E.K.; YILMAZER, D.; BAYKAL, T.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; ALPER, M.; YESILADA, E. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 468–477, 2010.

VICENTINI, F.T.M.C.; FONSECA, Y.M.; PITOL, D.L.; IYOMASA, M.M.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of Protective Effect of a Water-In-Oil Microemulsion Incorporating Quercetin Against UVB-Induced Damage in Hairless Mice Skin. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.12, n. 2, p. 274 – 285, 2010.

YAN, L; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349-351, 1995.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

DISCUSSÃO GERAL

O uso de óleos essenciais tem sido introduzido no tratamento de diversas infecções superficiais, visando à utilização de produtos de origem natural. Devido as suas variadas propriedades medicinais, como atividades antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e antiprotozoária, e sob o ponto de vista de segurança, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* tem sido empregado com êxito (COX et al., 2000; HAMMER; CARSON; RILEY, 2004; REICHLING et al., 2006; CARSON et al., 2008). Tendo em vista as suas potencialidades e considerando suas problemáticas peculiares de acondicionamento, armazenamento e incorporação em formas farmacêuticas, este estudo visou a possibilidade de obtenção de formulações que protegessem o óleo, aumentassem sua eficácia e proporcionassem proteção frente à volatilização.

Os sistemas nanoestruturados tem sido alvo de inúmeros estudos no âmbito farmacêutico e, atualmente, 17% de toda a inovação tecnológica trazida por esses sistemas focam na área farmacêutica (KAUR et al., 2010). Diversas são as vantagens conferidas por estas submicrométricas estruturas, como liberação precisa e segura do fármaco no local de ação (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010) e a melhora na estabilidade de substâncias, uma vez que fornecem proteção frente à degradação ocasionada por fatores externos (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; OURIQUE et al., 2008). Assim, a incorporação do óleo de melaleuca em sistemas coloidais como nanocápsulas e nanoemulsões, tornou-se uma atraente alternativa para contornar os obstáculos relacionados à sua utilização. Neste trabalho, a caracterização físico-química, estudos de estabilidade e a proteção do óleo frente à volatilização foram estudados. Adicionalmente, a atividade antifúngica dos sistemas nanoestruturados, especialmente em modelo *in vitro* de onicomicose, sua incorporação em base semissólida, caracterização e avaliação *in vivo* do efeito antiedematogênico e da atividade cicatrizante dos hidrogéis foram avaliadas. A comparação entre as diferentes formulações (suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão) foi, também, estabelecida.

Desse modo, a primeira parte deste trabalho foi delineada no sentido de verificar a viabilidade tecnológica da obtenção de nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de melaleuca na concentração de 10 mg/mL. Para a obtenção das nanocápsulas, um polímero biocompatível e biodegradável foi empregado [poli(ϵ -caprolactona)]. As nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas foram preparadas utilizando o método da emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004) e deposição interfacial de

polímero pré-formado (FESSI et al., 1989), respectivamente. As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, conteúdo de óleo e estabilidade frente ao armazenamento.

Inicialmente, o teste de inchamento do polímero foi realizado a fim de verificar a possibilidade de solubilização do polímero pelo óleo, prevendo, assim, uma possível desintegração da parede polimérica durante o armazenamento. Um pequeno aumento de peso foi observado nos três primeiros dias do experimento, permanecendo constante nos dias subsequentes até o término do 6º mês. Isto sugere que o polímero tem pouca interação com o óleo, indicando que após a preparação da suspensão de nanocápsulas, a parede polimérica não será dissolvida pelo mesmo, mantendo a proteção do núcleo oleoso.

Os sistemas nanoestruturados, após preparação, apresentaram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso, com reflexo azulado (efeito Tyndall). O reflexo azulado se deve ao movimento Browniano das partículas, devido ao seu tamanho nanométrico (SCHAFFAZICK et al., 2003). As formulações demonstraram tamanho nanométrico (158-200 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,25, pH levemente ácido e potencial zeta negativo. Estes resultados estão em concordância com os descritos na literatura para estas metodologias (SILVA, 2005; FRIEDRICH et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2009). O conteúdo de óleo ficou em torno de 96% da concentração teórica para ambas as formulações. Esta perda de cerca de 4% durante a preparação, provavelmente ocorreu durante o processo de evaporação do solvente. A literatura reporta valores percentuais de, aproximadamente, 30 e 40% relacionados à evaporação do óleo essencial de açafraão ocorrida durante o processo de evaporação do solvente na obtenção de nanocápsulas (LERTSUTTHIWONG et al., 2008; LERTSUTTHIWONG; ROJSITTHISAK; NIMMANNIT, 2009). Comparando estes resultados, se verifica que o processo empregado neste trabalho foi vantajoso e uma quantidade pequena de óleo foi perdida durante o processo de preparação das nanoestruturas. Para tal, estipulou-se um volume mínimo de solvente a ser retirado.

Ainda, no que se refere às características organolépticas, o odor das formulações foi analisado e sua intensidade foi comparada ao óleo puro. As nanocápsulas apresentaram odor menos intenso, seguidas pelas nanoemulsões. A fim de comparação, uma emulsão convencional foi, também, preparada e avaliada, a qual apresentou intensidade de odor semelhante à do óleo puro, embora um pouco mais suave. As formulações de nanocápsulas, pela presença da parede polimérica circundando o óleo, mascararam seu peculiar odor. Este resultado demonstra, novamente, a habilidade das nanocápsulas poliméricas em mascarar as

propriedades físico-químicas de algumas substâncias (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Uma das vantagens dos sistemas nanoestruturados é a comprovada capacidade de proteção das substâncias neles incorporadas (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009). Essa proteção foi verificada no estudo de evaporação. As formulações demonstraram diferentes potencialidades na proteção frente à perda por volatilização, sendo que após uma hora, as nanocápsulas apresentaram 55% do valor inicial de óleo, ao passo que para a emulsão convencional, esse valor foi de cerca de 30%. Assim, se torna evidente a proteção conferida pela parede polimérica frente à perda de óleo, podendo-se sugerir uma possível proteção frente às reações de degradação. Lai e colaboradores (2006) demonstraram a capacidade de reduzir a perda de óleo essencial quando este está associado à nanossistemas. Desta forma, a inclusão do óleo de melaleuca em suspensão de nanocápsulas poliméricas proporcionou uma maior proteção frente à volatilização.

No estudo de estabilidade, o tamanho de partícula e o índice de polidispersão mantiveram-se constantes para as duas formulações durante os dois meses. Entretanto, diferenças estatísticas a partir dos 30 dias foram observadas em relação ao potencial zeta das nanocápsulas. Sabe-se que o potencial zeta é influenciado por mudanças na interface entre a partícula e o meio (SHAFFAZICK et al., 2003). Por outro lado, os valores de pH apresentaram decréscimo tanto para as nanoemulsões como para as nanocápsulas, podendo este estar relacionado, no caso da nanoemulsão, com um maior contato do óleo com o meio aquoso, levando a uma possível degradação de alguns componentes e, para a suspensão de nanocápsulas, devido à relaxação da cadeia polimérica, com exposição de grupamentos carboxílicos terminais (SHAFFAZICK et al., 2003). Estes resultados estão em concordância com outros trabalhos reportados na literatura (JAGER et al., 2007; FONTANA et al., 2009). Após 30 dias de armazenamento, o conteúdo de óleo para ambas as formulações foi superior a 90%.

Após o desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo de melaleuca, a atividade antifúngica das formulações frente à *Candida albicans* e ao *Trichophyton rubrum* foi avaliada, e uma comparação entre os diferentes sistemas foi estabelecida na Publicação 2.

Primeiramente, a atividade antifúngica foi avaliada frente à levedura de *C. albicans*, a fim de verificar a influência exercida pelos sistemas propostos na inibição do crescimento da mesma, acompanhando a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) após 0 (tempo

inicial), 5, 8, 12, 24, 48, 72 horas de contato das formulações com a cepa. A quantidade de amostra utilizada correspondeu à metade da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo relatada para este microrganismo (CARSON *et al.*, 2006). Com o objetivo de obter melhor visualização das diferenças entre as formulações, duas concentrações da levedura foram utilizadas (10^3 - 10^4 e 10^5 UFC/mL). Para fins de comparação, uma emulsão convencional, com a mesma concentração de óleo foi, também, preparada e avaliada. Cabe salientar que ensaios com uma maior quantidade de óleo foram realizados, tendo sido evidenciada, uma inibição total da levedura nos tempos iniciais.

Utilizando a concentração inicial de *C. albicans* (próximo a 3,7 unidades log), as formulações contendo o óleo (suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão) foram capazes de reduzir o crescimento da levedura em 1,5 unidades log em relação à carga inicial, além de mantê-la constante durante 48 horas. Após este período, se verificou um aumento no crescimento para a nanoemulsão e essa retomada na viabilidade celular não foi observada para a suspensão de nanocápsulas. Com o aumento da carga inicial do inóculo (cerca de 5 unidades log), a nanoemulsão não demonstrou a mesma eficácia e as diferenças na atividade antifúngica entre as formulações apareceram após 24 horas de incubação, quando um acréscimo de cerca de 1,0 unidade log foi verificado para a formulação de nanoemulsões, o que não ocorreu para a suspensão de nanocápsulas ($p < 0.05$). Não obstante, uma redução no crescimento e a manutenção destes valores foram verificadas para a suspensão de nanocápsulas durante todo o experimento. Os componentes das formulações não demonstraram interferência no crescimento da levedura, sendo que para estas amostras, os valores encontrados foram similares ao crescimento do microrganismo em caldo nutriente (sem adição de amostras).

A incorporação do óleo de melaleuca nas nanoestruturas não resultou em perda de sua atividade, tampouco, a metodologia e os materiais empregados reduziram a ação do óleo, uma vez que, de acordo com a literatura, a ação antimicrobiana do mesmo pode sofrer interferência negativa pela presença de tensoativos e pelos constituintes orgânicos dos meios de cultura (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999). Com este estudo, foi possível verificar a diferença de desempenho entre os sistemas estudados e esta diferença pode estar relacionada com a composição e o tipo de estrutura. As nanocápsulas são caracterizadas pela presença de um núcleo oleoso (neste caso, composto pelo óleo de melaleuca) circundado por um invólucro polimérico, já as nanoemulsões apresentam-se como finas dispersões de óleo em água. Levando em consideração a presença da parede polimérica e a proteção conferida pelas nanocápsulas frente à volatilização (Publicação 1), o óleo não estaria totalmente disponível

para exercer seu efeito fungistático devido a sua lenta liberação para o meio externo (neste caso, o meio de cultura). Esta hipótese corrobora os estudos de liberação *in vitro* relatados na literatura que reportam que o tipo de estrutura e a presença do polímero exercem importante papel no controle de liberação de substâncias (POLETTO et al., 2008; FONTANA et al., 2009). Por outro lado, a rápida inibição conferida pela emulsão convencional provavelmente esteja relacionada à maior disponibilidade do óleo para exercer sua ação, aliado a baixa estabilidade física apresentada pela amostra, pois o fenômeno de coalescência foi observado. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho corroboram os encontrados por van Vuuren e colaboradores (2010), os quais observaram uma maior atividade antimicrobiana para o óleo de melaleuca quando incorporado em lipossomas revestidos por quitosana em comparação com os lipossomas sem revestimento. Este aumento da atividade proporcionada pelo revestimento polimérico foi atribuído à capacidade no controle de liberação de compostos bioativos.

Adicionalmente, neste trabalho foi realizado, pela primeira vez, um estudo utilizando unhas humanas como modelo de onicomicose para avaliar a atividade antifúngica de sistemas nanoestruturados. Sabe-se da dificuldade em reproduzir laboratorialmente esse tipo de infecção, especialmente utilizando a própria unha como substrato. Em função disso, a análise microscópica das unhas infectadas foi realizada, comprovando a existência de infecção (Figura 1). Cabe ressaltar a importância da utilização de unhas humanas como modelo de onicomicose, uma vez que a produção de artroconídeos (estruturas fúngicas responsáveis pela resistência aos antifúngicos) ocorre devido a mudanças no ambiente da infecção, ocasionadas por reações entre o tecido e o fungo (YAZDANPARAST; BARTON, 2006). Assim, dois modelos de infecção ungueal, que oportunizaram a reprodução das reais condições de infecção de unha, foram utilizados para avaliar a influência das nanoemulsões e nanocápsulas contendo o óleo de melaleuca no crescimento de *T. rubrum*. No primeiro, as unhas foram pulverizadas, contaminadas com o dermatófito e posteriormente tratadas com as amostras em estudo (o tratamento iniciou somente após o crescimento micelar). Após uma e duas semanas de tratamento, a contagem das UFC foi realizada. No segundo experimento, fragmentos de unha foram infectados e posteriormente tratados com as formulações. O diâmetro do crescimento da colônia fúngica foi mensurado. Em ambos os experimentos, as formulações controle (contendo os componentes utilizados na preparação das nanoestruturas) e uma emulsão convencional foram, também, empregadas.

Os resultados obtidos a partir do primeiro experimento demonstraram a eficiência dos sistemas coloidais e da emulsão convencional em reduzir a viabilidade de crescimento do dermatófito. Todas as formulações foram responsáveis por reduzir a contagem celular na

primeira semana de tratamento. Entretanto, somente a suspensão de nanocápsulas contendo o óleo foi capaz de impedir o crescimento no término da segunda semana, apresentando um pequeno decréscimo. Este crescimento se deu em menor grau para a nanoemulsão e maior para a emulsão convencional.

No experimento utilizando fragmentos de unhas (segundo modelo de onicomicose), novamente a suspensão de nanocápsulas demonstrou ser mais apta em reduzir o crescimento fúngico (Figura 1). Embora em menor proporção, a formulação de nanoemulsão também demonstrou redução do crescimento da hifa. O mesmo não foi observado para a emulsão convencional. Do modo como foi conduzido este experimento, para que o óleo surtisse seu efeito inibitório, seria necessário que ele transpusesse a unha e atingisse a hifa. Assim, esses resultados dão suporte para outros estudos que demonstram o aumento de efetividade de substância quando associadas a sistemas nanométricos. Neste experimento, ressaltamos a importância da penetração do ingrediente ativo através da unha, para que assim, atingisse o dermatófito. Esse é um aspecto importante no que diz respeito à terapia tópica e também o motivo da falência de muitas terapias. As substâncias ativas encontram dificuldades para penetrar na placa da unha, sendo esta uma barreira para alcançar as hifas, que permanecem entrelaçadas nas escamas de queratina (YANG et al., 1999). Com isso, baixas concentrações de fármacos são obtidas, aquém da concentração terapêutica. Uma das alternativas para transpor a barreira de queratina que compõe a unha humana é a utilização de promotores de penetração ungueal. A utilização de H₂O₂, uréia, resorcinol, tioglicolato de sódio, catequina, curcumina, 1,8 cineol, dentre outros, é estudada com o intuito de melhorar a penetração através da unha (KHENGAR et al., 2007); entretanto, a utilização destas substâncias deve ocorrer antecipadamente à utilização do antifúngico, o que acaba tornando o tratamento mais demorado e trabalhoso, podendo ocasionar o abandono do mesmo. Murdan (2002) relata a importância do tamanho molecular no transporte de substâncias através da unha. Outro parâmetro relevante reside na hidratação da placa ungueal. Gunt e Kasting (2007) demonstraram que a hidratação da unha aumenta a permeação de fármacos pouco solúveis. Assim, o uso de formulações aquosas é capaz de promover a hidratação da queratina, causando sua expansão e a subsequente formação de poros maiores, o que facilita a permeação de substâncias (MURDAN, 2002).

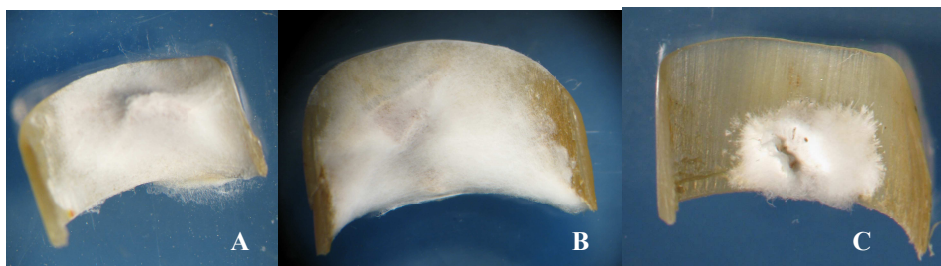


Figura 1. Fotografias das unhas infectadas com *T. rubrum*. Fragmento sem tratamento (A); tratamento realizado com a emulsão convencional (B) e a suspensão de nanocápsulas (C). Tratamento realizado durante 6 dias.

Há estudos que evidenciam melhoras nas atividades antimicrobianas de fármacos quando incorporados em sistemas coloidais, além de reduzirem a toxicidade celular de fármacos potencialmente tóxicos, como a anfotericina B. Quando incorporada em lipossomas, sua toxicidade eritrocitária reduziu significativamente (JUNG et al., 2009) e em estudos *in vivo*, foi capaz de, quando associada à nanopartículas poliméricas, diminuir as frequências de administração e reduzir a toxicidade hepática e renal em camundongos no tratamento de paracoccidiodomicose (AMARAL et al., 2009). Ainda, resultados antifúngicos mais satisfatórios foram atribuídos à sua forma nanoestruturada, em comparação à anfotericina B livre (PAULO; VIDAL; FERREIRA, 2010). O aumento da atividade antimicrobiana de fármacos, quando associados a estes sistemas submicrométricos é atribuída ao aumento da área superficial provida pela redução no tamanho de partícula, gerando um aumento na área de contato da substância ativa com o ergosterol da membrana fúngica. Ainda, há interações mais íntimas das nanoestruturas com os microrganismos (MURALIMOHAN et al., 2009), podendo promover uma difusão contínua do ativo para a membrana (LBOUTONE et al., 2002). O reduzido tamanho possibilita que um maior número de partículas contendo o fármaco se deposite na superfície fúngica, o que resulta numa maior exposição da substância ativa frente ao agente etiológico (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). A pronunciada efetividade das nanocápsulas pode ser atribuída à presença da parede polimérica, pelo fato dos polímeros apresentarem uma tendência em adsorver na membrana do microrganismo através de mecanismos estéricos e eletrostáticos (LBOUTONE et al., 2002). Tal adsorção direciona o ativo para o local de ação, ou seja, para as estruturas específicas do microrganismo (NHUNG et al, 2007).

De posse destas observações e dos resultados obtidos neste trabalho, a suspensão de nanocápsulas contendo o óleo de melaleuca demonstrou ser uma alternativa promissora em contornar os obstáculos da terapia tópica de onicomicose, agregando características

importantes como tamanho nanométrico de partícula, maior hidratação, proteção frente à volatilização, aumento no tempo de permanência e aderência no local da infecção.

Outra abordagem deste trabalho foi a incorporação dos sistemas nanoestruturados contendo o óleo essencial de *M.alternifolia* em formulações semissólidas (Publicação 3). Assim, géis hidrofílicos empregando Carbopol[®] Ultrez 10 NF foram preparados. As formulações semissólidas desenvolvidas foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, pH e espalhabilidade. Posteriormente, estas formulações foram submetidas a ensaios *in vivo* para avaliação da atividade antiedematogênica e do potencial de cicatrização de feridas cutâneas. Paralelamente, formulações controle (hidrogéis contendo os componentes empregados na preparação das nanoestruturas e hidrogel base) e contendo o óleo livre foram igualmente preparadas e avaliadas.

Os hidrogéis contendo o óleo associado à nanoemulsão e à suspensão de nanocápsulas poliméricas apresentaram características organolépticas satisfatórias, demonstrando aspecto homogêneo e brilhante, com coloração branca e o peculiar odor do óleo. As formulações controle diferiram apenas na ausência de odor do óleo. O hidrogel contendo o óleo na sua forma livre apresentou coloração esbranquiçada e o odor do óleo mais pronunciado. Com relação ao pH, todas as formulações apresentaram valores de pH levemente ácidos (5,4 a 5,7), tornando-os aptos a serem aplicados sobre a pele devido a sua compatibilidade com o pH epidérmico (KIM et al., 2006).

Para que uma formulação semissólida obtenha sucesso terapêutico, com alcance da dose necessária após a aplicação, é importante que essa formulação se espalhe adequadamente sobre a superfície da pele, proporcionando maior contato da substância ativa com a área desejada (GARG et al., 2002). Assim, a determinação da espalhabilidade é um teste importante a ser realizado no desenvolvimento de tais formulações e tem por objetivo avaliar a espalhabilidade das formulações frente à aplicação de uma determinada força, relacionando com a aplicação no local desejado, além de fornecer informações a respeito da consistência dos produtos. Através desse estudo, pode-se evidenciar que os hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados apresentaram maior espalhabilidade, abrangendo uma maior área quando uma massa de, aproximadamente 505g foi adicionada. Além disso, diferenças em relação ao hidrogel base não foram observadas ($p > 0,05$). Por outro lado, o hidrogel contendo o óleo na sua forma livre demonstrou uma espalhabilidade significativamente menor em relação aos hidrogéis contendo as nanoestruturas. Cabe salientar que formulações que apresentam maior espalhabilidade e que necessitam de uma menor força para aplicação são adequadas no tratamento de algumas doenças cutâneas, especialmente quando processos inflamatórios e

dolorosos estão envolvidos. Desta forma, os hidrogéis preparados a partir dos sistemas nanoestruturados se mostram vantajosos.

Dando continuidade aos estudos de desenvolvimento de formulações, buscando ampliar a possibilidade de utilização destes sistemas no tratamento de desordens cutâneas, estudos *in vivo* a cerca da atividade antiedematogênica e cicatrizante dos hidrogéis foram realizados.

A atividade anti-inflamatória do óleo de melaleuca, em humanos, tem sido reportada, como a redução de lesões na pele tipo “vergões” e do edema induzidos por histamina (KOH et al., 2002) e a redução de reações de hipersensibilidades induzidas por níquel (PEARCE; FINLAY-JONES; HART, 2005). Para avaliar uma resposta anti-inflamatória conferida pela aplicação tópica dos hidrogéis contendo o óleo de melaleuca na sua forma livre e nanoestruturada, o efeito protetor frente aos danos causados pela radiação UVB foi realizado. Assim, camundongos foram pré-tratados com os hidrogéis uma hora antes e 4 horas após exposição à luz UVB. Após este período, a espessura das orelhas dos camundongos foi mensurada, verificando-se a possibilidade de redução do edema formado e, desta forma, seu efeito antiedematogênico. Uma redução significativa do inchaço das orelhas foi promovida pela aplicação dos hidrogéis contendo a nanoemulsão e a suspensão de nanocápsulas, em comparação com o grupo que não recebeu tratamento. O hidrogel contendo o óleo livre não demonstrou proteção frente à radiação. Brand e colaboradores (2002) conduziram um estudo semelhante, no qual não foi evidenciado o efeito protetor do óleo de melaleuca frente aos efeitos irritantes provocados pela radiação UVB. Os autores atribuíram este fato à alta taxa de volatilização do óleo e às possíveis reações de degradação ocorridas durante a exposição do óleo à radiação. Assim, a proteção conferida pelas nanoestruturas frente à perda de óleo por volatilização (Publicação 1) e a possibilidade de fotoproteção das nanocápsulas relatada em alguns trabalhos (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009) justificam a ação protetora observada somente para o óleo associado aos sistemas nanoestruturados.

Na avaliação da atividade cicatrizante dos hidrogéis, o percentual de redução da ferida foi acompanhado ao longo dos 6 dias de tratamento. Adicionalmente, os níveis de antioxidantes também foram quantificados ao final do 6º dia. A ação cicatrizante das formulações foi mais pronunciada para o hidrogel contendo o óleo associado à suspensão de nanocápsulas ($p < 0,05$), sendo a única formulação a apresentar uma redução da ferida maior que a apresentada para o grupo tratado com o hidrogel contendo alantoína, substância empregada como controle positivo em função de sua conhecida ação cicatrizante. O hidrogel contendo o óleo livre apresentou ação cicatrizante, entretanto, sua ação foi inferior ao controle

positivo. Embora o hidrogel contendo o óleo associado à nanoemulsão ter apresentado atividade cicatrizante, diferenças entre os hidrogéis contendo a suspensão de nanocápsulas e óleo livre foram verificadas. Estudos demonstram uma satisfatória atividade cicatrizante do óleo de melaleuca, especialmente em feridas acometidas por *Staphylococcus aureus* (HALCÓN; MILKUS, 2004; EDMONDSON et al., 2011).

A quantificação dos níveis de substâncias antioxidantes no processo de cicatrização é importante uma vez que ocorre a produção de substâncias reativas de oxigênio (ROS) durante a fase inflamatória da cicatrização, com o intuito de realizar uma proteção frente a agentes externos (KONDO, 2007). Entretanto, quando essa fase é prolongada, ocorre uma produção exacerbada dessas espécies, podendo acarretar danos celulares e tissulares irreversíveis (SCHÄFER; WERNER, 2008). A fim de avaliarmos melhor a atividade cicatrizante das formulações, a quantificação de substâncias antioxidantes foi realizada nos tecidos das feridas. Os níveis de glutathione e atividade de catalase demonstraram-se elevados somente para os grupos tratados com o hidrogel contendo o óleo associado à nanocápsulas. Os níveis de vitamina C apresentaram-se elevados tanto para o hidrogel contendo a suspensão de nanocápsulas quanto para o hidrogel contendo a nanoemulsão, sem diferença significativa entre as leituras ($p > 0,05$). Para os animais tratados com as demais formulações, não houve aumento considerável nos níveis destes antioxidantes. Esses resultados corroboram a importância atribuída aos antioxidantes em preservar o dano tecidual ocasionado pelos radicais livres, combatendo-os e, assim, contribuindo para o processo de cicatrização (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Sabendo-se que reduzindo a fase inflamatória da cicatrização diminui o dano tecidual pela ação dos radicais livres em excesso (KOH et al., 2002) e que a preservação da área da ferida ao ataque de microrganismos tem papel fundamental para o processo de reparação (SÜNTAR et al. 2010) e, ainda, fazendo uma ligação entre todo o processo de cicatrização e os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a atividade antiedematogênica apresentada para os hidrogéis, o aumento da produção de antioxidantes, aliada a proteção frente à volatilização e a notória atividade antimicrobiana da suspensão de nanocápsulas contendo o óleo de melaleuca, contribuíram satisfatoriamente para a atividade cicatrizante do hidrogel contendo estas nanoestruturas.

Desta forma, após as observações postuladas neste trabalho se verifica que a nanoencapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* constitui uma estratégia inovadora e vantajosa para a obtenção de formulações tópicas a serem empregadas no tratamento de distúrbios cutâneos, contornando alguns de seus obstáculos farmacotécnicos, além de

aumentar suas consolidadas propriedades biológicas. Além disso, a associação do óleo em suspensão de nanocápsulas poliméricas demonstrou, novamente, a importância destes nanocarreadores em melhorar as propriedades de substâncias e sua aplicação na obtenção de nanoestruturas contendo produtos de origem vegetal.

CONCLUSÕES

- Neste trabalho, foi realizada uma proposta de obtenção de suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo como ingrediente ativo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. As formulações desenvolvidas apresentaram características físico-químicas satisfatórias e adequada estabilidade.
- A incorporação do óleo em nanocápsulas poliméricas proporcionou sua proteção frente à volatilização, aumentando sua estabilidade.
- Na avaliação da atividade antifúngica do óleo frente à levedura de *Candida albicans* a formulação de nanocápsulas contendo o óleo possibilitou a redução e o controle do crescimento do microrganismo.
- Os modelos *in vitro* de onicomicose propostos neste trabalho mostraram-se adequados para a avaliação da atividade antifúngica das formulações nanoestruturadas.
- A associação do óleo aos sistemas nanoestruturados possibilitou prevenir e tratar infecções causadas pelo *Trichophyton rubrum*, sugerindo sua potencialidade no tratamento tópico de infecções ungueais. Além disso, maior efeito foi observado para a suspensão de nanocápsulas contendo o óleo de melaleuca.
- Os resultados obtidos na caracterização físico-química de hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados foram satisfatórios, demonstrando a viabilidade tecnológica de obtenção de formulações semissólidas de base aquosa com o óleo de melaleuca.
- Estudos *in vivo* demonstraram o potencial dos hidrogéis, especialmente os que contêm o óleo associado à suspensão de nanocápsulas, em diminuir o edema formado na pele da orelha de camundongos após exposição à radiação UVB, demonstrando seu potencial efeito antiedematogênico.
- Na avaliação *in vivo* da atividade cicatrizante dos hidrogéis, o tratamento das feridas cutâneas com o hidrogel contendo o óleo de melaleuca associado à nanocápsulas apresentou melhores resultados, aliado ao aumento nos níveis dos antioxidantes (glutaciona, atividade de catalase e vitamina C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 142–146, 2008.

ALMEIDA, J.S. Formulações nanoestruturadas contendo rutina: desenvolvimento, atividade antioxidante *in vitro* e efeito sobre a cicatrização cutânea, 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PEASE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent : preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 10, p. 1818-1825, 2004.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900-904, 2005.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.

AMARAL, A.C.; BOCCA, A.L.; RIBEIRO, A.M.; NUNES, J.; PEIXOTO, D.L.G.; SIMIONI, A.R.; PRIMO, F.L.; LACAVA, Z.G.M.; BENTES, R.; TITZE-de-ALMEIDA, R.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; FELIPE, M.S.S. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidiodomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 526–533, 2009.

ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 673-679, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BASSET, L.B.; PANNOWITZ, D.L.; BAMESTON, R. St.C. A comparative study of tea tree oil *versus* benzoylperoxide in the treatment of acne. **Medical Journal of Australia**, v. 153, n. 8, p. 455-458, 1990.

BENGER, S.; TOWNSEND, P.; ASHFORD, R.L.; LAMBERT, P. An *in vitro* study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **The foot**, v. 14, p. 86-91, 2004.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. ; Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2080, p. 241-251, 2004.

BOZZUTO, G.; COLONE, M.; TOCCACIELI, L.; STRINGARO, A.; MOLINARI, A. Tea Tree Oil Might Combat Melanoma. **Planta Medica**, v.77, p. 54-56, 2011.

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. **Inflammation Research**, v. 51, p. 236-244, 2002.

BUCK, S.D.; NIDORF, D.M., ADDINO, J.G. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. **Journal of Family Practice**, v. 38, n. 6, p. 601-605, 1994.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; SALVATORE, G.; MONDELLO, F.; ARANCIA, G.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, The main Component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the *In Vitro* Growth of Human Melanoma Cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 349-360, 2004.

CARSON, C.F.; ASHTON, L.; DRY, L.; SMITH, D.W.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 450-451, 2001.

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, 2006.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 24-25, 1994.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 78, p. 264-269, 1995.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; COOKSON, B.D. Efficacy and safety of treatment of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 175-178, 1998.

CARSON, C.F.; SMITH, D.W.; LAMPACHER, G.J.; RILEY, T.V. Use of deception to achieve double-blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 29, p. 9-19, 2008.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 277-299, 2010.

CHAN, K.K.; Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 47-57, 2001.

CHOI, M-J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S-G.; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. **Food Research International**, v. 42, p. 48-156, 2009.

CHOUHAN, R.; BAJPAI, A.K. Release dynamics of ciprofloxacin from swellable nanocarriers of poly(2-hydroxyethyl methacrylate): an in vitro study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 453-462, 2010.

COELHO, L.M.; AQUINO-FERREIRA, R.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 758-761, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 492-497, 2001.

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, p. 170-175, 2000.

DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; MOOTER, G.V.; LUDWIGA, A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 72–82, 2006.

DRAKE, L.A.; PATRICK, D.L.; FLECKMAN, P.; ANDRÉ, J.; BARAN, R.; HANEKE, E.; SAPÈDE, C.; TOSTI, A. The impact of onychomycosis on quality of life: Development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 41, p. 189-96, 1999.

EDMONDSON, M.; NEWALL, N.; CARVILLE, K.; SMITH, J.; RILEY, T.V.; CARSON, C.F. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. **International Wound Journal**, v.8, n.4, p. 375-384, 2011.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and their individual Volatile Constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ELZATAHRY, A.A.; ELDIN, M.S.M. Preparation and characterization of metronidazole loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application. **Polymers Advanced Technologies**, v. 19, p. 1787–1791, 2008.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, B.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.-PH.; YGARTUA, P. Poly(e-caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 19-27, 1997.

EVANS, E.; ROBERTS. Subungal dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 138, n. 1, p. 189-190, 1998.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.-PH.; 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.

FINCH, J.J.; WARSHAW, E.M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 31-46, 2007.

FONTANA, M.C. Nanopartículas contendo propionato de clobetasol: preparação, caracterização e incorporação em hidrogéis, 2010. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 1–10, 2009.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, *in press*.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M.C.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexametazone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Quimica Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84–105, 2002.

GARG, J.; TILAK, R.; GARG, A.; PRAKASH, P.; GULATI, A.K.; NATH, G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. **BioMedicalCenter Research Notes**, v. 2, n. 60, p. 1-6, 2009.

GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 806-808, 2009.

GREAY, S.J.; IRELAND, D. J.; KISSIK, H. T.; HEENAN, P. J.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; BAILHARZ, M. W. Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 66, p. 1095-1102, 2010.

GUNT, H.; KASTING, G.B. Effect of hydration on the permeation of ketonazole through human nail plate *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 254-260, 2007.

GUPTA, H.; AQIL, M.; ROOP, K.; KHAR, R.K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 324–333, 2010.

GUTERRES, S.S., ALVES, M.P., POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALCÓN, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of Tea Tree Oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 402-408, 2004.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 446-452, 1999.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 195-199, 2002.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 853-860, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1081-1085, 2004.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 170–173, 2008

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.616–625, 2006.

HARKENTHAL, M.; REICHLING, J.; GEISS, H.K.; SALLER, R. Comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil and eucalyptus oil. **Pharmazie**, v. 54, p. 460-463, 1999.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n.2, p. 83-91, 2002.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; PRAGER, R.H.; FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619-626, 2000.

HAUSEN, B.B.; REICHLING, J.; HARKENTHAL, M. Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agents in tea tree oil. **American Journal of Contact Dermatitis**, v.10, p. 68-77, 1999.

HAY, R.J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **Journal of American Academy of Dermatology**, *in press*.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 297-305, 2007.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTI, F.S.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, J.P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 130-140, 2009.

JUNG, S.H.; LIM, D.H.; JUNG, S.H.; LEE, J.E.; JEONG, K.-S.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B- entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 313-320, 2009.

KANBE, T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis, **Mycopathologia**, v. 166, p. 307-317, 2008.

KAUR, K.; GUPTA, A.; NARANG, R.K.; MURTHY, R.S.R. Regulations in Nanotechnology: A Brief Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n.9, p. 2083-2087, 2010.

KHENGAR, R.H.; JONES, S.A.; TURNER, R.B.; FORBES, B.; BROWN, M.B. Nail Swelling as a Pre-formulation Screen for the Selection and Optimization of Ungual Penetration Enhancers. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2207-2212, 2007.

KIM, M-K.; CHOI, S-Y.; BYUN, H-J.; HUH, C-H.; PARK, K-C.; PATEL, R.A.; SHINN, A.H.; YOUN, S-W. Evaluation of gender difference in skin type and pH. **Journal of Dermatological Science**, v. 41, p. 153—156, 2006.

KOBAYASHI, Y.;KOMATSU, T.; SUMI, M.;NUMAJIRI, S.; MIYAMOTO, M.; KOBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. *In vitro* permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 471-477, 2004.

KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea Tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **British Journal of Dermatology**, v. 147, p. 1212-1217, 2002.

KONDO, T. Timing of skin wounds. **Legal Medicine**, v. 9, p. 109–114, 2007.

LAI, F.; WISSING, S. A.; MÜLLER, R.; FADDA, A. M. *Artemisia arborensis* L Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application: Preparation and Characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, article 2. p. E1-E9, 2006.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J. F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROTA, P. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a Digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319–334, 2002.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSAND, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 209–214, 2008.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 856–860, 2009.

LIOLIOS, C.C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOI, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, p. 77–83, 2009.

LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; YAO, L.; GU, C.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **European Food Research Technology**, v. 229, p. 247-253, 2009.

LOUGHLIN, R.; GILMORE, B.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p. 428–433, 2008.

LUENGO, J.; WEISSB.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K.H; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 190-197, 2006.

MARCHIORI, M.L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R.B. ; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L.A.; SILVA, C.B.; TEDESCO, S.B.; BECK, R.C.R. Hydrogel containing dexametasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962-971, 2010.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369–383, 2008.

MARTY, J-P.L. Amorolfine nail laquer: a novel formulation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4(Suppl.1), S17-S21, 1995.

McCAGE, C.M.; WARD, S.M.; PALING, C.A.; FISCHER D.A.; FLYNN, P.J.; McLAUGHLIN, J.L. Development of a paw paw herbal shampoo for the removal of head lice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 743–748, 2002.

MILÃO, D.; KNORST, M.T.; GUTERRES, S.S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physic-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325- 329, 2003.

MIGNON, B.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; VERMOUT, S. Immunization and dermatophytes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 134–140, 2008.

MISHRA, B.; PATEL, B.B; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p. 9–24, 2010.

MIYASAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: In vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Pharmacy and and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 2040-245, 2003.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 270-276, 2008.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A. PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 522- 530, 2007.

MURALIMOHAN, A.; EUN, Y-J. ; BHATTACHARYYA, B.; WEIBEL, D.B. Dissecting microbiological systems using materials science. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 100-108, 2009.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 1- 26, 2002.

NAKASHIMA, T.; NOZAWA, A.; ITO, T.; MAJIMA, T. Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail with dermatophyte *in vitro*. **Journal of Infect Chemotherapy**, v. 8, p. 331-335, 2002.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C. RODRIGUES,C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NHUNG, D.T.T.; FREYDIERE, A-M.; CONSTANT, H.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex®) **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 166–172, 2007.

NUCHUCHUA,O.; SAKULKU, U.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. In vitro Caracterização and Mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent Activity os Essential-Oils-Loaded Nanoemulsions. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1234-1241, 2009.

NOSKIN, G.A.; RUBIN, R. R; SCHENTAG, J.J.; KLUYTMANS, J.; HEDBLOM, E.C.; SMULDERS, M.; LAPENTINA, E.; GEMMEN, E. The burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Holpitals in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n 15, p. 1756-1761, 2005.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T.; PONTIERI, E.; AURELI, P.; FERRINI, M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 185-187, 2003.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; SILVA, C. B.; 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**, p. 95-101, 2011.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1–4, 2008.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles- an antimicrobial study. **Science and Tecnology of Advanced Materials**, v. 9, 035004 (7pp), 2008.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nanoencapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268-276, 2005.

PANDEY, R.; ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83, p. 373–378, 2003.

PAPADOPOULOS, C.J.; CARSON C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 449–451, 2006.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366 p. 170-184, 2009.

PAULO, C. S. O.; VIDAL, M.; FERREIRA, L. S. Antifungal Nanoparticles and Surfaces. **Biomacromolecules** 11, 2810–2817, 2010.

PEARCE, A.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. **Inflammation Research**, v. 54, p. 22-30, 2005.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155–168, 2000.

PINTO, P.; ROSADO, C.; PARREIRÃO, C.; RODRIGUES, L.M. Is there any barrier impairment in sensitive skin?: a quantitative analysis of sensitive skin by mathematical modeling of transepidermal water loss desorption curves. **Skin Research and Technology**, v.17, p. 181–185, 2011

POLETTO, F.S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 472–478, 2008.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.; SCHAEFER, U. F. *In vitro* studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 222-228, 2006.

REPKA, M., A.; MIDIDODDI, P.K.; STODGHILL, S., P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 95-106, 2004.

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. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 48, p. 83–87, 2007.

SABOKTAKIN, M.R.; TABATABAIEA, R.M.; MAHARRAMOV, A.; RAMAZANOV, M.A. Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan- Poly(methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 403–407, 2011.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, L. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug discovery today**, v. 8, n 24, p. 1112-1120, 2003.

SAHOO, S.K., PARVEEN, M.S.; PANDA, M.S. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, S.; RUKTANONCHAI, U. Characterization and mosquito repellent

activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 105–111, 2009.

SANDHIYA,S.; DKHAR, S.A.; SURENDIRAN, A. Emerging trends of nanomedicine- an overview. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 263-269, 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71–80, 2000.

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

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 165–171, 2008.

SCHAR, R.K. Nail disorders – one of dermatology’s last frontiers. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 1–2, 2007.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R-M.; KARRER, S.; HEINLIN, J.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, p. 373–378, 2010.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Editora Guanabara Koogan S.A. Copyright. Rio de Janeiro, RJ, 2004.

SILVA, C.B.; Novas formas farmacêuticas contendo óleo volátil de *Cymbopogon citratus*: estudos de formulação, estabilidade e atividade biológica. 2005. 238 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós- Graduação Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L’ALLORET, F. Nanoemulsions :a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 145-149, 2004.

SÜNTAR, I.P.; AKKOL, E.K.; YILMAZER, D.; BAYKAL, T.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; ALPER, M.; YESILADA, E. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 468–477, 2010.

SUMITRA, M.; MANIKANDANA, P.; SUGUNAB, L. Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 566–573, 2005.

SYED, T. A.; QURESHI, Z.A; ALI, S.M.; AHMAD, S.A. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. **Topical Medicine and International Health**, v. 4, n. 4, p. 284-287, 1999.

UACCB.http://web.uaccb.edu/AcademicDivisions/MathScience/Science/BWheeler/Ess/figs/04_09Figure-U.jpg. Acesso na web em 29.08.2011.

VAN VUUREN, S.F.; TOIT, L.C.; PARRY, A.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E. Encapsulation of Essential Oils within a Polymeric Liposomal Formulation for Enhancement of Antimicrobial Efficacy. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 9, p.1401 – 1408, 2010.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, 2009.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p: 267–275, 2008.

WALTON,S.F.; McKINNON, M.; PIZZUTTO, S.; DOUGALL, A.; WILLIAMS, E.; CURRIE, B.J. Acaricidal Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil. **Archives of Dermatology**, v. 140, p. 503-506, 2004.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F.S.; ZANCAN, L.R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.

YADAV, M.; AHUJA, M. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordia, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 871–877, 2010.

YANG, D.; MICHELL, L.; CHAUMONT, J-P.; MILLET-CLERC, J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis **Mycopathologia**, v. 148, p.79–82, 1999.

YAZDANPARAST, A.S.; BARTON, R.C. Arthroconidia production in *Tricophyton rubrum* and a new *ex vivo* model of onychomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1577-1581, 2006.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261–267, 2005.