UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNNA EMANUELLY GUEDES DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DO IBUPROFENO E CARVACROL EM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS POR UPLC

CAMPINA GRANDE
2024

BRUNNA EMANUELLY GUEDES DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DO IBUPROFENO E CARVACROL EM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS POR UPLC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

CAMPINA GRANDE
2024

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

O48d Oliveira, Brunna Emanuelly Guedes de.

Desenvolvimento de método analítico para análise simultânea do ibuprofeno e carvacrol em sistemas nanoemulsionados por UPLC [manuscrito] / Brunna Emanuelly Guedes de Oliveira. - 2024.

49 p.

Digitado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024. "Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. UPLC. 2. Nanoemulsão. 3. Validação de métodos analíticos. 4. Farmacologia. I. Título

21. ed. CDD 615.19

Elaborada por Bruno R. F. de Lima - CRB - 15/1021 BC/UEPB

BRUNNA EMANUELLY GUEDES DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DO IBUPROFENO E CARVACROL EM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS POR UPLC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Aprovada em: 27/09/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Prof. Dra. Dayanne Tomaz Casimiro da Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar
Universidade Federal da Paraíba (UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela concessão de sabedoria, discernimento e entendimento nos momentos em que mais precisei. Expresso minha gratidão pela oportunidade de concluir meu mestrado e por ter colocado pessoas especiais em minha vida durante essa jornada. Meus eternos agradecimentos vão para:

Minha mãe, Francyneide, que esteve sempre ao meu lado, ensinando-me valiosas lições no dia a dia. Agradeço por ter criado um ser humano grato, capaz de reconhecer o esforço dedicado ao meu aprendizado. Sua presença constante em minha vida e os ensinamentos sobre a importância do estudo para ampliar as possibilidades de conhecimento e capacidade são inestimáveis.

Ao meu irmão Matheus Henrique, pelo incentivo, apoio e reconhecimento ao longo desta trajetória profissional, por acreditar sempre em mim.

Aos familiares, em especial à minha avó Luiza (*in memoriam*) e Lineide, meu padrasto Adriano Zeca, meus tios e meu pai Manoel, que torceram intensamente para que eu superasse as dificuldades, e a Mércia e Stella por ter me cedido a moradia em João Pessoa para que facilitasse minha ida ao mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elquio Eleamen de Oliveira, agradeço por toda a sabedoria compartilhada, pelo empenho e pela ajuda ao longo da minha graduação. O suporte total em minhas pesquisas, a assistência no trajeto para a universidade, a mão estendida nos momentos mais cruciais e a demonstração de que sempre somos capazes.

Ao meu companheiro Helder Gomes, te agradeço por me incentivar e acreditar tanto em mim.

À Universidade Estadual da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, e a todos os colaboradores e docentes do curso de Farmácia, meu profundo agradecimento.

À Paulo Dantas, professor na graduação e auxiliador no mestrado, tive a oportunidade de tê-lo como professor e suas ricas discussões contribuíram muito para minha formação. Além disso, agradeço pelo auxílio na realização de análises realizadas neste estudo. Muito obrigada!

Aos queridos professores, Lidiane Pinto, Francisco Jaime, Bolívar Ponciano e Germano, que me auxiliaram no translado de materiais de João Pessoa para Campina e cederam os materiais necessários para a conclusão do meu mestrado.

Aos amigos de mestrado que me incentivaram ao longo dessa jornada e estiveram ao meu lado durante o mestrado, em especial a Adrian, Gabryella, Lorena, Karla, Thassia e Yvnni, vocês são únicos.

Agradeço ao Profa. Dra. Dayanne Tomaz Casimiro da Silva e a Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar pelos ensinamentos, e por gentilmente aceitarem participar da minha banca de defesa do mestrado.

Ao CM-ACQuimBio pelas análises e caracterizações de minhas amostras.

Ao LVSM, Labdem e PPGCPF, agradeço aos grupos pelo apoio no desenvolvimento das formulações.

“O impossível não é um fato, é uma opinião, estude, cresça, evolua e seja a melhor versão de você.’’
Brunna Emanuelly (adaptado – Mario Sério Cortella)

RESUMO

Os avanços em nanotecnologia têm transformado a indústria farmacêutica, permitindo o desenvolvimento de sistemas terapêuticos mais eficazes, com menor toxicidade e efeitos adversos. As nanoemulsões (NEs) se destacam por sua alta estabilidade cinética, melhorando a biodisponibilidade de compostos ativos e aumentando a permeabilidade de substâncias com baixa solubilidade. Dessa forma, o presente estudo teve a finalidade de desenvolver uma nanoemulsão contendo ibuprofeno (IBP) e carvacrol (CRV) e validar método para quantificação por UPLC. Nesse sentido, as NE foram preparadas pelo método de alta energia através da utilização de um sonicador. Para a nanoemulsão contendo o IBP+CRV, foram preparadas três formulações de IBP contendo 50mg, 100mg e 200mg. As análises cromatográficas foram realizadas usando uma fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila:água acidificada a 0,1% com ácido fórmico (60/40; v/v), com vazão de 0,7mL.min^{-1} e detecção em 230 nm. O método foi validado de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão inter/intra-dia, exatidão e robustez, bem como análises no PDI, PZ e tamanho da gotícula. O método demonstrou-se seletivo possuindo uma distinção no tempo de retenção do CRV (9,2 min) e o IBP (11,02 min). A linearidade foi demonstrada na faixa de concentração de IBP e CRV de 50 a 100 µg/mL e 100 a 200 µg/mL (r^2 = 0,999 e r^2 = 0,998), respectivamente, atendendo a resolução RE nº. 166. Os limites de detecção e quantificação para IBP e CRV foram 3,54 e 5,19 µg/mL, 8,64 e 12,81 µg/mL, respectivamente. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) para intradia e a precisão entre dias foi inferior a 5%, e a taxa média de recuperação foi de 94,85% na concentração de 10 mg/mL para o IBP e uma taxa média de recuperação de 88,57% na concentração de 30 mg/mL para CRV, demonstrando que o método teve capacidade de quantificar amostras de IBP e CRV presentes na nanoemulsão. As nanoemulsões apresentaram tamanho médio de gotícula entre 143 e 376.5 nm, com PDI próximo de 0,3 e potencial zeta negativo. Após 60 dias de formulação, as nanoemulsões mostraram-se macroscopicamente estáveis, preservando a aparência leitosa sem formação de creme ou separação de fases. Conclui-se, portanto, que o presente trabalho apresentou resultados satisfatórios que comprovaram a confiabilidade do método, indicando que este é reprodutível, atendendo aos critérios tanto da ANVISA quanto do INMETRO, sugerindo novos avanços no campo de

pesquisa, com potencial para desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes. Além disso, a nanoemulsão contendo IBP e CRV mostrou-se promissora, destacando-se pela estabilidade e capacidade de manter as propriedades dos compostos ativos ao longo do tempo.

Palavras-Chave: UPLC; nanoemulsão; validação de métodos analíticos.

ABSTRACT

Advances in nanotechnology have improved the pharmaceutical industry, allowing the development of more effective therapeutic systems with lower toxicity and adverse effects. Nanoemulsions (NEs) stand out for their high kinetic stability, improving the bioavailability of active compounds and increasing the permeability of substances with low solubility. Thus, the present study aimed to develop a nanoemulsion containing ibuprofen (PPI) and carvacrol (CRV) and validate a method for quantification by UPLC. In this sense, the NEs were prepared by the high-energy method using a sonicator. For the nanoemulsion containing PPI+CRV, three PPI formulations containing 50mg, 100mg and 200mg were prepared. Chromatographic analyses were performed using a mobile phase containing a mixture of acetonitrile:water acidified at 0.1% with formic acid (60/40; v/v), with a flow rate of 0.7 mL.min-1 and detection at 230 nm. The method was validated according to the parameters of selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), inter/intra-day precision, accuracy and robustness, as well as analyses in PDI, PZ and droplet size. The method proved to be selective and has a distinction in the retention time of CRV (9.2 min) and IBP (11.02 min). Linearity was demonstrated in the IBP and CRV concentration range of 50 to 100 µg/mL and 100 to 200 µg/mL (r^2 = 0.999 and r^2 = 0.998), respectively, meeting resolution RE no. 166. The limits of detection and quantification for PAI and CRV were 3.54 and 5.19 µg/mL, 8.64 and 12.81 µg/mL, respectively. The relative standard deviation (RSD) values for intraday and interday precision were less than 5%, and the average recovery rate was 94.85% at a concentration of 10 mg/mL for IBP and an average recovery rate of 88.57% at a concentration of 30 mg/mL for CRV, demonstrating that the method was capable of quantifying IBP and CRV samples present in the nanoemulsion. The nanoemulsions presented an average droplet size between 143 and 376.5 nm, with PDI close to 0.3 and negative zeta potential. After 60 days of formulation, the nanoemulsions showed macroscopic results, preserving the milky appearance without creaming or phase separation. It is concluded, therefore, that the present work presented overwhelming results that proved the reliability of the method, showing that it is reproducible, meeting the criteria of both ANVISA and INMETRO, revealing new advances in the field of research, with potential for the development of safer and more effective therapies. In addition, the nanoemulsion containing IBP and CRV showed

promise, standing out for its stability and ability to maintain the properties of the active compounds over time.

Keywords: UPLC; nanoemulsion; validation of analytical methods.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	11
2	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**	13
2.1	**Anti-inflamatórios Não Esteroides**	13
2.2	**Ibuprofeno**	13
2.2.1	*Farmacocinética*	15
2.2.2	*Características físico-químicas*	15
2.3	**Carvacrol**	16
2.4	**Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos**	18
2.4.1	*Nanoemulsões: Estrutura e Estabilidade*	19
2.4.2	*Nanoemulsões, Emulsões e Microemulsões*	20
2.4.3	*Estabilidade Físico-química das Nanoemulsões*	21
2.4.4	*Método de preparo das nanoemulsões*	23
2.5	**Métodos analíticos de quantificação**	25
2.6	**Validação do método analítico**	27
3	**OBJETIVOS**	29
3.1	**Objetivo Geral**	29
3.2	**Objetivos Específicos**	29
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**	30
4.1	**Substâncias e Reagentes**	30
4.1	**Equipamentos analíticos**	30
4.3	**Métodos**	30
4.3.1	*Preparação e caracterização de nanoemulsões*	30
4.3.2	*Método Analítico*	31
4.3.3	*Preparação de soluções estoque e soluções de trabalho*	32
4.3.4.1	***Seletividade***	32
4.3.4.2	***Linearidade***	32
4.3.4.3	***Limite de detecção e quantificação***	33
4.3.4.4	***Precisão e Exatidão***	33
4.3.4.5	***Robustez***	34
4.3.4.6	***Recuperação (Eficiência de Extração)***	35
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	36
5.1	**Preparação e caracterização de nanoemulsões**	36
5.2	**Validação do método analítico**	38
5.2.1	*Seletividade*	39
5.2.2	*Linearidade*	40
5.2.3	*Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)*	41
5.2.4	*Precisão*	42
5.2.5	*Exatidão*	42
5.2.6	*Robustez*	43
5.3	**Aplicabilidade do método**	44
6	**CONCLUSÃO**	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias, como artrite, tendinite e outras condições crônicas, afetam milhões de pessoas em todo o mundo, causando dor, inchaço e comprometimento na qualidade de vida. Para tratar esses sintomas, é essencial o uso de medicamentos que não apenas aliviem a dor, mas também combatam diretamente o processo inflamatório. Nesse contexto, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são a principal escolha para prescrições em todo o mundo para o tratamento da inflamação (UHLMANN, 2021).

Os principais benefícios dos AINEs, residem na sua capacidade analgésica, anti-inflamatória e antipirética, que resulta da inibição das atividades das enzimas ciclooxigenases COX-1 e COX-2, tanto a nível central como periférico, levando à diminuição dos mediadores da inflamação, dor e febre (LIMA et al., 2020). Também estão associados a um elevado número de todos os efeitos colaterais relatados (OLIVEIRA JUNIOR; UHLMANN, 2021).

O Ibuprofeno (IBP), um dos AINEs mais utilizados, tem sido formulado em diversas preparações tópicas, mas é difícil manter concentrações eficazes por apresentar baixa permeação cutânea. O uso de nanoemulsões é considerado um dos veículos mais promissores para melhorar a estabilidade e permeação do ibuprofeno na pele. Isso se deve ao tamanho reduzido das gotas e ao uso de surfactantes, que garantem a estabilidade da emulsão (GAZZI et al., 2021) (FERRARIS, 2021) (ASHAOLU, 2021).

O carvacrol (CRV), um fenol monoterpenóide, é um dos principais componentes encontrados em óleos essenciais obtidos de diversas espécies vegetais, como Origanum vulgare, Lippia gracilis e Thymus vulgaris (CAMILO, 2022) (LOMBREA, 2020) (GALOVIČOVÁ, 2021). O Carvacrol apresentou potente atividade anti-inflamatória. Estudos anteriores relataram uma grande variedade de efeitos biológicos do carvacrol, tais como efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antitrombóticos que são atribuídos, pelo menos em parte, aos seus efeitos inibitórios sobre uma ou ambas as ciclooxigenases (COXs), bem como inibição de vias de sinalização do fator nuclear (NF)-kB e proteínas quinases ativadas por mitógeno

(MAPK) ou a ativação do receptor g ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-g).

Nanoemulsões são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis estabilizados com surfactantes (ABDELHAMEED, 2021) (MCCLEMENTS, 2021). Algumas das razões para o crescente uso de nanoemulsões em diferentes aplicações são seu pequeno tamanho que implica estabilidade contra formação de creme ou sedimentação, juntamente com baixa viscosidade, controle de liberação, aumento de biodisponibilidade, alta estabilidade física e alta relação superfície/volume (ZHANG, 2018) (FELÍCIO, 2021).

Portanto, no presente trabalho foi desenvolvido uma nanoemulsão contendo ibuprofeno e carvacrol com a finalidade de obter um método analítico para quantificação de Ibuprofeno e Carvacrol sendo avaliado por meio da Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UPLC) com o objetivo de avaliar parâmetros de validação, incluindo linearidade, precisão, exatidão e robustez do método analítico, permitindo verificar a capacidade do método de fornecer resultados precisos e confiáveis para a quantificação simultânea de IBP e CRV em nanoemulsões.

2 FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Anti-inflamatórios Não Esteroides

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são amplamente utilizados para o tratamento da dor, inflamação, edema, osteoartrite, artrite reumatoide e distúrbios do músculo esquelético e eventos relacionados ao processo inflamatório. (ROMAINE, 2021).

A inflamação é uma sequência de respostas que inclui a dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, a migração de leucócitos dos capilares e a formação do exsudato celular. A ação anti-inflamatória envolve a redução do eritema por vasoconstrição e a desidratação dos tecidos com edema. Os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são frequentemente utilizados para tratar dor e inflamação, agindo principalmente pela inibição das ciclooxigenases, o que previne a produção de mediadores pró-inflamatórios, especialmente as prostaglandinas responsáveis pela inflamação. Existem duas formas principais dessas enzimas: ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2. Elas convertem o ácido araquidônico, derivado dos lipídios na membrana celular pela ação da fosfolipase A2, em prostaglandinas e tromboxanos. O efeito antipirético dos AINEs está particularmente ligado à inibição da prostaglandina E2, um mediador chave na ativação do centro regulador da temperatura no hipotálamo. Altos níveis de prostaglandina E2, comuns em estados inflamatórios como infecções, aumentam a temperatura corporal. Além disso, essas prostaglandinas sensibilizam as terminações nervosas locais da dor, que são estimuladas por outros mediadores inflamatórios, como a bradicinina (SIQUEIRA *et al*., 2020).

Os anti-inflamatórios não esteroides derivados do ácido propiônico apresentam vantagens em relação, por exemplo, ao ácido acetilsalicílico, à indometacina ou aos derivados pirazólicos, pois são, em geral, mais bem tolerados. O ibuprofeno (IBP) foi o primeiro a ser utilizado na terapêutica e, por isso, a experiência com este fármaco é superior (LIMA et al., 2021).

2.2 Ibuprofeno

O IBP foi sintetizado pela primeira vez em dezembro de 1961 no Reino Unido por Dr. Stewart Adams, que identificou seus efeitos anti-inflamatórios, e pelos

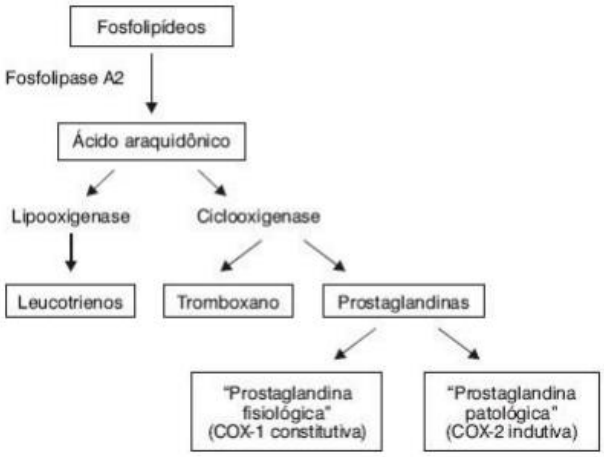
seus colegas John Nicholson - o químico que realizou a síntese da molécula - e Colin Burrows, o técnico (Cann, 2005).

O desenvolvimento do IBP foi baseado na necessidade de se obter um fármaco mais seguro do que a Aspirina, que embora amplamente utilizada, apresenta efeitos gastrointestinais graves (RAINSFORD, 2011). A procura de substâncias alternativas à aspirina, com maior atividade anti-inflamatória, menor irritação gástrica, ou ainda de ação mais longa, diminuindo a dose diária administrada, era a razão para o estudo e desenvolvimento do IBP (MARQUES, 2015). O desenvolvimento do IBP tinha ainda como objetivo suprir de certa forma o uso de tais fármacos, devido a seus sérios efeitos adversos (RAINSFORD, 2011). Em 1969, o IBP começou a ser comercializado no Reino Unido, para a indicação de doenças reumáticas (HALFORD, 2012). Posteriormente, foi aprovado também nos EUA, em 1974.

O IBP também denominado de ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico; ácido α-metil-(2-metil-propil fenil) acético e ácido 4-isobutil-α-metil-fenilacético (Stahly e Starrett, 1997; Higgins et al. 2001), é um composto aromático que possui fórmula estrutural apresentada na Figura 2. A sua apresentação farmacêutica é variada, podendo apresentar-se sob a forma de comprimidos, cápsulas, suspensão oral, granulado, supositórios, creme ou gel de aplicação local. No entanto, a sua absorção gastrintestinal é fraca devido à baixa solubilidade ou dissolução na água (HÖRTER; DRESSMAN, 1997; KYSELOVIČ et al., 2020).

O IBP combate a dor nos pacientes. Quando as células sofrem danos, elas liberam o ácido araquidônico. As enzimas COX-1 e COX-2 (ciclooxigenases) transformam o ácido araquidônico em prostaglandina, que é transformada em outros elementos, responsáveis por aumentar a febre e provocar o processo inflamatório. Como toda enzima, possui um local ativo (parte em que todas as reações ocorrem), os locais ativos das enzimas COX-1 e COX-2 reagem facilmente ao ácido araquidônico e preenchem o local ativo. Agora, quando o paciente ingere o ibuprofeno, o fármaco ocupa o local ativo, o que faz com que a prostaglandina não seja produzida, o que minimiza a dor, a inflamação ou a febre. Na Figura 1 é exposto o mecanismo de ação do ibuprofeno (MELO et al., 2020; ROMAINE et al., 2021).

Figura 1. Mecanismo de ação do ibuprofeno



Fonte: ROMAINE et al., 2021.

2.2.1 Farmacocinética

O IBP é rapidamente absorvido após a administração oral, liga-se extensivamente a proteína plasmática (90-99%), seu volume de distribuição é de aproximadamente 0,1 L/Kg e as concentrações máximas plasmáticas são observados após 15-30 min. Quando formulado particularmente para uso tópico, o ibuprofeno penetra rápida e extensamente através da pele (aproximadamente 22% da dose aplicada em 48 horas), atingindo concentrações locais elevadas. Não existem diferenças apreciáveis no metabolismo ou na excreção do ibuprofeno entre a administração oral e a administração tópica. A depuração plasmática é de aproximadamente 0,05 L/h/kg (ACEVEDO et al., 2021).

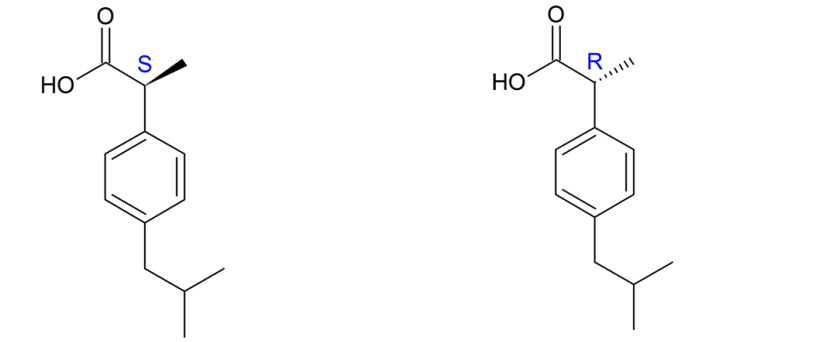
Verifica-se que o ibuprofeno sofre metabolização oxidativa hepática, sendo esta devida principalmente à isoenzima CYP2C9. A excreção do ibuprofeno é rápida e completa. Mais de 90% da dose é excretada na urina como metabólitos e seus conjugados. O ibuprofeno propriamente dito não é detectado na urina (ACEVEDO et al., 2021).

2.2.2 Características físico-químicas

O IBP possui a aparência de um pó cristalino branco, massa molecular igual a 206,28 g/mol, é facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em acetato de etila, e praticamente insolúvel em água, possuindo

a fórmula química $C_{13}H_{18}O_2$. Trata-se de um fármaco com característica ácida, pois é um derivado do ácido propiônico, apresentando valor de pKa igual a 4,5 (RIVERA-LEYVA et al., 2012). O IBP possui um carbono quiral, sendo comercializada como uma mistura racêmica, sendo o enantiômero mais importante o enantiômero (S)-ibuprofeno pois apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética, sendo o outro enantiômero (R)- ibuprofeno inativo (Figura 2). Além disso, o IBP é considerado um ácido orgânico de estrutura assimétrica por apresentar um centro estereogênico (HARIRFOROOSH 2020).

Figura 2. Estrutura química das duas formas isoméricas do ibuprofeno.



(S)-Ibuprofeno:Forma biologicamente ativa (R)-Ibuprofeno:Forma biologicamente inativa

Fonte. BOWER, 2020.

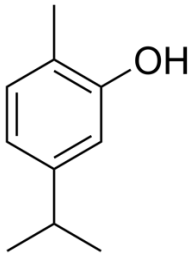
Nesse contexto, além das propriedades anti-inflamatórias do ibuprofeno, o carvacrol tem ganhado destaque principalmente por possuir diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, antitumorais, antivirais e anti-inflamatórias (SOUZA et al. 2022).

2.3 Carvacrol

O Carvacrol (CRV) (Figura 3), também conhecido como isopropil-o-cresol, ρ-cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol, possui potente ação anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica anticarcinogênico e propriedades antioxidantes. O CRV possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, massa molecular de 150,22 g mol^{-1}, LogP 3,52 e densidade de 0,976 g/ml a 25°C, além disso, se apresenta com caráter lipofílico e é insolúvel em água, mas altamente solúvel em éter dietílico, etanol e acetona (DE VINCENZI et al., 2004; ARFA et al., 2006). O CRV é um monoterpeno fenólico, líquido à temperatura ambiente, pertencente aos óleos essenciais produzidos

por uma grande variedade de plantas aromáticas como, Lamiaceae, utilizadas como especiarias na culinária, incluindo orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), pimenta (*Lepidium flavum*), cominho preto (*Nigella sativa*) e outras plantas como Alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis* Schauer), sendo este último encontrado abundantemente no Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2015; SHARIFI-RAD et al., 2018). A maior concentração natural de carvacrol, cerca de 80 % da composição do óleo essencial, encontra-se no orégano (BURT, 2004). Por outro lado, o CRV também pode ser sintetizado por métodos químicos e biotecnológicos (APROTOSOAIE et al., 2018).

Figura 3: Estrutura química do carvacrol



Fonte: RODRIGUES, 2021.

A atividade anti-inflamatória do CRV foi relatada por diversos estudos (CARVALHO et al., 2020; EZZ-ELDIN; ABOSEIF; KHALAF, 2020). No entanto, existem alguns mecanismos de ação possíveis para o carvacrol. Alguns estudos sugerem que o carvacrol tem atividade anti-inflamatória por interferir na cascata do ácido araquidônico (WAGNER; WIERER; BAUER, 1986; LANDA et al., 2009). A inibição dessa via impede a produção de prostaglandinas (importante agente estimulador de respostas inflamatórias), como tromboxano, prostaglandinas e prostaciclinas (LIMA et al., 2013). Outros autores confirmaram essa atividade anti-inflamatória ao longo dos anos e testaram outros mecanismos de ação como a inibição de citocinas pró-inflamatórias (MAHMOODI et al., 2019; GHOLIJANI; AMIRGHOFRAN, 2016). O carvacrol demonstrou atividade na inibição de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) -α, interleucina (IL) -6, interferon-gama (IFN) -γ, IL-17 e IL1β, que são mediadores inflamatórios (KARA et al., 2015; MAHMOODI et al., 2019; LI et al., 2016). Além disso os mediadores anti-inflamatório, como fator transformador de crescimento (TGF) -β, IL-10 e IFN-γ, aumentaram os níveis em presença do CRV (KHAZDAIR; BOSKABADY, 2019; MAHMOODI et al., 2019).

O carvacrol apresenta promissoras propriedades biológicas, principalmente, efeito antimicrobiano associado a suas características hidrofóbicas do anel aromático e hidrofílicas do grupo hidroxila (MEMAR et al., 2017). O composto proporciona ação antimicrobiana devido ao aumento da permeabilidade e fluidez da membrana plasmática bacteriana que pode acarretar na coagulação do citoplasma e no extravasamento de constituintes vitais à manutenção celular (MUTLU-INGOK, 2020; SHARIFI-RAD et al., 2018). A hidroxila (OH) do carvacrol é associada ao efeito no transporte de transmembrana de cátions monovalentes responsável por processos como perturbações na força motriz para a síntese de ATP e na síntese da flagelina (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

No entanto, uma das grandes dificuldades tecnológicas em relação aos monoterpenos, tais como o CRV, é a sua preservação durante o processamento e estocagem, devido a sua fácil oxidação. Além de apresentarem insolubilidade em água, limitando sua utilização (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013). Com isso, várias abordagens vêm sendo utilizadas para melhorar as propriedades desses monoterpenos, incluindo o nanoencapsulamento, promovendo uma maior estabilidade e liberação controlada desses materiais (CHALLA et al., 2005; HADARUGA, 2012).

2.4 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos

A nanotecnologia farmacêutica está relacionada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas em escala nanométrica, que podem variar de 1 a 100 nanômetros (nm) (Regis et al., 2021). Dessa forma, tem como característica proporcionar ao fármaco a sua liberação controlada, possibilitando dessa forma que o mesmo, seja entregue num receptor específico mantendo suas concentrações plasmáticas em níveis constantes, por um período controlado de tempo (de Melo et al., 2020; Dias et al., 2021).

Na área farmacêutica, existem inúmeros estudos sobre a aplicação desta nova tecnologia, que evidenciam a eficácia de nanomedicamentos, sendo considerado uma possível ferramenta para o tratamento de diversas doenças, trazendo dessa forma grandes benefícios para a saúde humana, por meio do carreamento eficiente de

fármacos com a liberação controlada e como também a diminuição da resistência de alguns medicamentos (Luna-Herrera et al., 2021; Da Rocha Pitta et al., 2021).

Os sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos visam transportar o fármaco até o local específico no organismo, liberando-o de maneira controlada e mantendo uma concentração constante dentro da faixa terapêutica desejada no plasma. Nas formulações de SLC, são utilizados dispositivos que criam uma barreira entre o fármaco e o ambiente externo, protegendo-o contra fatores como temperatura, pH, oxidação, redução, entre outros que podem comprometer a eficácia do tratamento. Essas barreiras podem ser formadas por técnicas como nano/microencapsulação, revestimentos, dissolução ou adesão a uma matriz, e também por dispositivos osmóticos (LYRA, 2022).

Com a busca de sistemas terapêuticos mais eficazes, que garantam a baixa toxicidade, reduzam os efeitos adversos e diminuam as doses, a nanotecnologia é uma alternativa para a inovação dos medicamentos, principalmente, quando se refere a liberação controlada do fármaco. Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer destaca-se a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, mantendo seus níveis plasmáticos em concentrações constantes (BEZERRA, 2022).

O uso da nanotecnologia na farmácia abrange dispositivos para a entrega de princípios ativos, diagnósticos de imagem mais detalhados, tratamentos direcionados ao nível molecular e suporte na identificação de antígenos relacionados a doenças como câncer e condições neurodegenerativas, além de microrganismos e vírus causadores de infecções. Entre os sistemas mais reconhecidos na nanotecnologia estão as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões (NEs) (SCHLICHTING, 2023).

2.4.1 Nanoemulsões: Estrutura e Estabilidade

Nanoemulsões são sistemas coloidais cineticamente estáveis geralmente de óleo em água que podem encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos (McCLEMENTS, 2012; SOUTO et al., 2022; TADROS et al., 2004). Tais sistemas coloidais são caracterizados por serem dispersões obtidas a partir de dois líquidos imiscíveis, possuindo assim, duas fases, em que pequenas gotículas de uma das fases (a fase *dispersa*) estão dispersas na outra fase (fase *contínua*), sendo

necessário para a estabilização da fase aquosa (água) e fase oleosa (óleo essencial), o uso de tensoativo (ou surfactantes), para a obtenção de amostras homogêneas e estáveis (HUNTER, 2001; REHMAN et al., 2020; TADROS et al., 2004). As nanoemulsões, assim como as emulsões convencionais, podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) e dependendo do método de preparação dessas dispersões e das matérias-primas utilizadas, diferentes distribuições de tamanhos de gotículas podem ser obtidas. Além disso, existem as emulsões múltiplas que são conhecidas como emulsões binárias ou duplas, apresentando um sistema mais complexo para formar as emulsões: água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). Devido à complexidade de sua estrutura, as emulsões múltiplas apresentam diversas aplicações nas áreas farmacêutica, alimentícia e cosmética, porém não são sistemas estáveis. As limitações das emulsões múltiplas estão relacionadas à instabilidade termodinâmica e física que é caracterizada pela separação de fases (CONTRERAS-RAMÍREZ et al., 2022).

Uma das principais vantagens da nanoemulsões (NEs) é a sua alta estabilidade cinética, melhoria da biodisponibilidade de compostos ativos, aumento da permeabilidade de substâncias com baixa solubilidade e a baixa turbidez quando comparadas aos sistemas de emulsões convencionais. Além disso, as NEs apresentam vantagens como a veiculação de ativos tanto hidrofílicos como lipofílicos na mesma formulação (SHETH et al., 2020).

Os sistemas de NEs podem ter como componentes incorporados às formulações, além de tensoativos e a fase aquosa (geralmente água destilada, pura ou Milli-Q), os óleos essenciais (OEs), extratos alcoólicos de vegetais, óleos vegetais, nanopartículas metálicas, fármacos convencionais, entre outros (SHETH et al., 2020).

2.4.2 Nanoemulsões, Emulsões e Microemulsões

NEs apresentam características físico-químicas distintas das emulsões: podem ser opticamente claras devido à fraca dispersão de luz, são altamente estáveis à separação gravitacional devido a forças gravitacionais fracas e efeitos de movimento browniano, possuem maior biodisponibilidade que emulsões por conta da digestão mais rápida, e maior reatividade química devido à maior área interfacial óleo-água (MCCLEMENTS 2015; JAFARI, 2018).

Uma das principais vantagens das NEs é a possibilidade de proteção do fármaco frente as instabilidades do organismo, mantendo seus níveis constantes, obtenção de estabilidade cinética, liberação controlada do fármaco, mudança do perfil de biodisponibilidade dos agentes encapsulados, aumento da absorção, penetração e biodisponibilidade do fármaco carreado. Além disso, bioativos hidrofóbicos, hidrofílicos ou anfifílicos podem ser incorporados em NE, e a incorporação de ativos nas gotículas de lipídios pode protegê-los da degradação química iniciada por componentes na fase aquosa (PORTO et al., 2020; MCCLEMENTS, 2015). Portanto, essa tecnologia é uma alternativa promissora para o uso de substâncias como o carvacrol, que possuem limitações quanto à solubilidade, degradação química e potencial terapêutico.

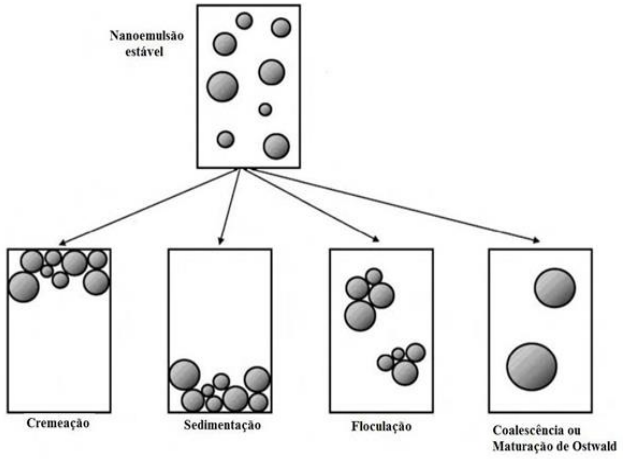
Enquanto as microemulsões, são dispersões formadas espontaneamente de dois líquidos imiscíveis que geralmente são água e óleo, estabilizados por tensoativo e co-tensoativo. São definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, com tamanhos de gotículas da fase dispersa que varia entre 10 a 100nm. Os agentes tensoativos desempenham papel fundamental na estabilização de Mês por possuírem a propriedade de diminuir a tensão interfacial entre óleo e água.

2.4.3 Estabilidade Físico-química das Nanoemulsões

Apesar das NEs geralmente possuírem maior estabilidade cinética do que as emulsões convencionais (com maiores diâmetros de gota), elas apresentam instabilidade termodinâmica por conta da maior área interfacial que possuem. Dessa forma, as NEs apresentam resistência a mudanças físico-químicas no meio, porém, suas fases podem se separar e formar um complexo heterogêneo ao longo do tempo (JOANITTI; DE MORAES; DE AZEVEDO, 2022; McCLEMENTS, 2005).

Os principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade cinética das nanoemulsões são apresentados na Figura 4.

Figura 4- Fenômenos físico-químicos que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões.



Fonte: McCLEMENTS, D. J., WEISS, J., 2005).

A separação gravitacional é causada pela força da gravidade agindo sobre as gotículas, devido à diferença de densidade entre as gotículas e a fase contínua. Quando as gotículas possuem densidade menor que a da fase contínua, elas tendem a subir, fenômeno conhecido como cremação. Por outro lado, se as gotículas têm densidade maior que a da fase contínua, elas tendem a descer, caracterizando a sedimentação.

A floculação ocorre quando as gotas mantêm sua característica, porém se agrupam formando agregados de gotas individuais devido às forças atrativas fracas entre elas (DALTIN, 2020). A sedimentação, cremação e floculação podem ser reversíveis, a coalescência é o passo anterior à separação definitiva de fases e, portanto, considerada irreversível. A coalescência é um fenômeno onde as gotas se unem para a formação de gotas maiores e ocorre em quatro etapas, sendo elas a floculação, a drenagem de filme fino, a ruptura do filme e a fusão das gotas. Esse fenômeno pode rapidamente levar à cremação ou sedimentação, e eventualmente à separação de fases (DALTIN, 2020).

No amadurecimento de Ostwald (*Ostwald ripening*, em inglês) ocorre uma transferência de matéria de gotículas menores para maiores, impulsionada pela diferença entre os raios de curvatura das gotas, ou seja, causa um aumento no tamanho das partículas, ocorrendo quando gotículas menores encolhem e são absorvidas pelas maiores. Isso acontece porque a energia livre das gotículas menores é maior do que a das maiores, fazendo com que as pequenas sejam absorvidas pelas grandes por meio da difusão competitiva. Esse fenômeno pode, ao longo do tempo,

levar à redução de todas as gotículas a uma única, resultando na separação de fase (KOROLEVA, 2021).

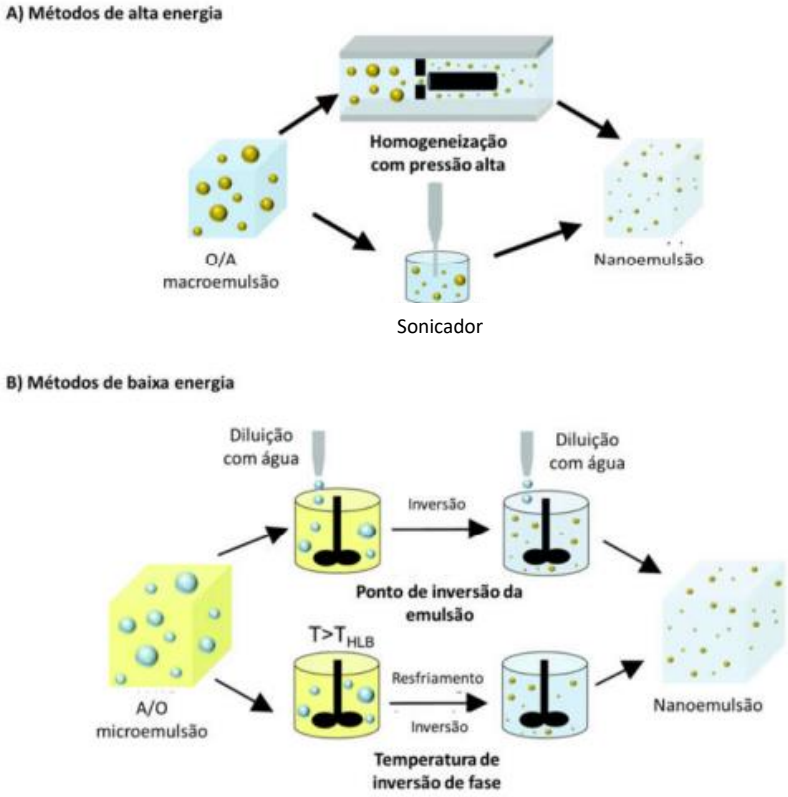
Portanto, as nanoemulsões são mais propensas à desestabilidade pela maturação de Ostwald devido ao pequeno tamanho das gotículas. Porém, apresentam vantagens quando comparadas com emulsões óleo em água e microemulsões (ME), pois ainda devido a este pequeno tamanho, ocorre a diminuição dos fenômenos de agregação dessas gotículas (floculação e coalescência) e da separação gravitacional, fazendo com que as mesmas sejam mais estáveis cineticamente (DALTIN, 2020).

Devido aos fenômenos descritos, corrobora-se que quanto menor o tamanho das gotículas, maiores os benefícios quanto à estabilidade cinética. Assim, o grande objetivo da produção de nanoemulsões é produzir gotículas suficientemente pequenas para garantir a estabilidade cinética em função do tempo para aplicações industriais (McCLEMENTS, 2012; HASAFA et al., 2022).

2.4.4 Método de preparo das nanoemulsões

O preparo de nanoemulsões exige o uso de técnicas específicas para reduzir o tamanho das gotículas e alcançar uma maior estabilidade do sistema. Essas técnicas se dividem em dois grupos principais: métodos de baixa energia e métodos de alta energia (CHE MARZUK et al., 2019; WILSON, 2021; ZHOU, 2022). Um método de cada categoria é ilustrado na Figura 5.

Figura 5- Visão geral dos métodos de alta e baixa energia para a preparação de NEs. A) de alta energia: homogeneizadores de alta pressão e ultrasonicação de ponteira, B) de baixa energia: ponto de inversão da emulsão e temperatura de inversão de fase.



Fonte: GUPTA, 2016.

Entre os métodos de baixa energia mais utilizados, destacam-se a emulsificação espontânea e a inversão de fase. Na emulsificação espontânea, o processo depende da energia química interna do sistema e dos componentes a serem emulsionados. Esse método aproveita as propriedades físico-químicas intrínsecas da mistura dos líquidos da fase aquosa (FA) e oleosa (FO), juntamente com os emulsificantes (CHE MARZUK et al., 2019; ZHOU, 2022).

No método de inversão de fase, o processo ocorre a uma temperatura constante e envolve uma diluição gradual entre as fases oleosa e aquosa. Esse procedimento provoca uma inversão de fase durante a emulsificação, causada pela alteração nas proporções dos componentes, resultando na formação de nanogotículas (CHE MARZUK et al., 2019; ZHOU, 2022).

O método de inversão de fase por temperatura requer variações de temperatura. A mudança de temperatura provoca uma alteração estrutural na emulsão; por exemplo, uma emulsão O/A (óleo em água) pode se transformar em A/O (água em óleo) com o aumento da temperatura, atingindo um ponto de equilíbrio. Durante o resfriamento, em um determinado ponto onde a tensão superficial do sistema está baixa, ocorre a formação de nanogotículas dispersas (CHE MARZUK et al., 2019; WILSON, 2021).

Por outro lado, os métodos de alta energia utilizam equipamentos para fornecer a energia necessária para a formação das gotículas. As energias mecânicas aplicadas podem incluir agitação, sonicação e pressão, com o objetivo de romper a tensão superficial entre as duas fases e facilitar a redução do tamanho das gotículas. O método de alta energia é realizado em duas etapas: primeiro, a quebra das gotículas em nanogotículas e, em seguida, a inserção dos tensoativos na interface para garantir a estabilidade da emulsão (CHE MARZUK et al., 2019).

A técnica de alta pressão utiliza um homogeneizador que, sob alta pressão, faz a emulsão contendo as fases oleosa e aquosa estabilizadas com tensoativos passar por um canal estreito. Essa alta pressão gera uma grande força de cisalhamento, resultando na diminuição das gotas. O processo pode ser repetido várias vezes até que a nanoemulsão esteja devidamente homogeneizada e uniforme (ZHOU, 2022; WILSON et al., 2021). A sonicação utiliza um equipamento chamado sonicador, que emite ondas ultrassônicas e provoca vibrações que rompem a interface O/A, dispersando as fases oleosa e aquosa e gerando gotículas menores e mais uniformes. Essa técnica é considerada simples, eficiente e de baixo custo, produzindo gotículas com aproximadamente 100 nm, embora alguns ativos possam se degradar devido às ondas ultrassônicas, e sua produção seja limitada a pequenas escalas (ZHOU, 2022).

Já a técnica de microfluidização utiliza um microfluidizador, que possui uma bomba de alta pressão para conduzir as emulsões por microcanais em uma câmara de interação, onde são homogeneizadas. A pressão acelera as emulsões em alta velocidade, criando forças de cisalhamento e impacto que fazem com que colidam entre si. Após completar o ciclo da bomba, o fluxo é invertido, e o produto é pressurizado novamente, repetindo o processo. Embora esse método seja caro, ele reduz o tempo de preparo e resulta em gotículas com distribuição mais uniforme (CHE MARZUK et al., 2019; WILSON, 2021; ZHOU, 2022).

2.5 Métodos analíticos de quantificação

A cromatografia líquida (CL), consiste em uma técnica utilizada para identificar, quantificar e separar os componentes de uma mistura com ajuda de um meio poroso sob a influência de solventes. Antes de 2004, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) era amplamente utilizada para a separação de misturas em seus componentes individuais e continua sendo uma técnica eficiente até hoje. No entanto,

a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), introduzida pela Waters Corporation, surgiu como uma técnica mais recente, trazendo avanços significativos em termos de eficiência e superando algumas das limitações do HPLC. Ambas as técnicas são eficazes, mas a UPLC oferece maior desempenho em determinadas aplicações devido à sua maior capacidade de separação e análise rápida. (FINGERHUT, 2016)

Os princípios do UPLC são os mesmos do HPLC, no entanto, a UPLC é considerada um avanço para cromatografia líquida, trazendo mudanças na sensibilidade, resolução e na velocidade da análise a ser calculada, possuindo instrumentação que pode funcionar em pressões mais altas em comparação com o HPLC (YUANBIN, 2016). A técnica UPLC é baseada no princípio de utilização de uma fase estacionária consistindo em partículas com menos de 2,0 µm enquanto HPLC as colunas geralmente são preenchidas com partículas de 3–5 µm, dessa forma, a técnica de UPLC é capaz de melhorar a velocidade, sensibilidade e resolução da avaliação além de reduzir o consumo de solvente e economizar tempo. Também permite uma análise muito rápida. Os princípios básicos desta evolução são governados pela equação de van Deemter, como mostra na equação 1, que confirma a relação entre velocidade linear (vazão) e altura da placa (eficiência da coluna). Dessa forma, o tamanho da partícula é uma das variáveis desta equação, e à medida que o tamanho da partícula diminui para menos de 2,0 µm, há um ganho significativo em eficiência, análise, tempo e capacidade de pico (ZHAN, 2016; MONTERO 2019).

$$H = A + \frac{B}{u} + C.u \qquad \textbf{(1)}$$

Em que, H é a altura equivalente a um prato teórico, u é a velocidade linear da fase móvel, A é o termo relacionado à difusão de Eddy (desigualdade dos caminhos percorridos pelas moléculas na coluna, dependendo da sua trajetória entre as partículas do adsorvente), B é o termo relacionado à difusão longitudinal (difusão das moléculas ao longo da coluna, tendendo a espalhar as bandas de soluto) e C é o termo relacionado à resistência à transferência de massa (diferença de tempo para as moléculas se equilibrarem entre a fase móvel e a fase estacionária) (GUSEV et al., 1999).

A análise do IBP por cromatografia líquida de ultra eficiência é usada mundialmente para controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Este método permite analisar tanto IBP quanto produtos de degradação, como 4-

isobutilacetofenona (Pharmacopèe Europèenne, 2002; monografia ANMAT, 2003; Ravisankar *et al.*, 1998; Lampert e Stewart, 1990; Farmacopeia dos EUA, 2002).

2.6 Validação do método analítico

A validação de métodos analíticos é um processo crucial para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em análises laboratoriais. Segundo a resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, essa validação deve ser baseada em estudos experimentais que comprovem a eficácia do método para atender às exigências das aplicações analíticas. Os principais parâmetros avaliados durante a validação incluem seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e robustez.

A seletividade é fundamental, pois garante que o método seja capaz de identificar o analito de interesse mesmo na presença de interferentes, como substâncias quimicamente semelhantes. A linearidade, por sua vez, estabelece uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito e a resposta do método, sendo normalmente verificada por meio de uma curva de calibração, que deve ter um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, indicando uma correlação forte entre as variáveis.

A precisão é uma medida da reprodutibilidade dos resultados em ensaios independentes, enquanto a exatidão avalia o grau de concordância entre os resultados experimentais e um valor verdadeiro aceito. A exatidão é frequentemente determinada através de ensaios de recuperação, que indicam a capacidade do método de quantificar o analito de forma confiável.

Os limites de detecção e quantificação são importantes para determinar a sensibilidade do método. O limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser identificada, enquanto o limite de quantificação indica a menor quantidade que pode ser medida com precisão e exatidão adequadas.

A robustez do método refere-se à sua capacidade de manter a confiabilidade diante de pequenas variações nas condições analíticas, como mudanças de temperatura, pH ou tipo de solvente. Essa avaliação é essencial para garantir que o método permaneça eficaz em diferentes cenários operacionais.

Assim, a validação abrangente de métodos analíticos, considerando todos esses parâmetros, assegurando que os resultados obtidos sejam consistentes,

precisos e adequados às finalidades propostas, contribuindo significativamente para a qualidade das análises realizadas em laboratórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma nanoemulsão contendo ibuprofeno e carvacrol e validar um método analítico para quantificação simultânea por cromatografia líquida de ultra eficiência.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma nanoemulsão pelo método de alta energia contendo Ibuprofeno e Carvacrol;
- Caracterizar os sistemas obtidos, contemplando as análises de aspecto macroscópico, tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta;
- Desenvolver um método analítico por UPLC para quantificar simultaneamente os compostos Ibuprofeno e Carvacrol em nanoemulsão;
- Validar um método analítico a partir a RDC 166/2017;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias e Reagentes

- Ibuprofeno (2-(4-isobutilfenil) propiônico), Aldrich (São Paulo, Brasil);
- Carvacrol (5-isopropryl-2-metinfenol), Sigma – Aldrich (São Paulo, Bras;
- Ácido Fórmico 85% (CH2O2) PA – NEON;
- Água de osmose reversa, Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular – LSVM (João Pessoa, Brasil);
- Água ultrapura, Biograde (Anápolis, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (ACN), JT Baker (Carnaxide, Portugal);
- Polissorbato 80 (Tween 80®), Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro - Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®), Sigma – Aldrich (Missouri - EUA); Etanol, Merck (Barueri - Brasil).

4.2 Equipamentos analíticos

- Balança analítica (modelo AUW220D- SHIMADZU);
- Banho de ultrassom (modelo 14000ª – Unique);
- Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível (modelo Genesys 10S UV-Vis)
- ZetaSizer Ultra (Malvern Instruments, Reino Unido);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (modelo LC-20 AD);
- Sonicador (modelo QR200, Ultronique, São Paulo - Brasil);

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação e caracterização de nanoemulsões

As NE foram preparadas pelo método de alta energia através da utilização de um sonicador durante 4 min a 300 W e 20 kHz usando uma sonda de 13 mm de diâmetro em banho de gelo (modelo QR200, Ultronique, Indaiatuba, SP, Brasil), adaptando a metodologia de Limongi et. al 2024. As gotículas da nanoemulsão foram compostas por um núcleo lipídico formado por carvacrol e estabilizadas por um invólucro surfactante composto por uma mistura de surfactantes (Tween 80 -0,56g- e Span 80 – 0,33 g), disperso em fase aquosa. A nanoemulsão branca (ver tabela 3), foi composta por CRV e surfactantes e foram pesados 300mg de CRV e 900mg de

surfactantes, que foram então pré-emulsionadas em vórtex. Para a nanoemulsão contendo o IBP+CRV, foram preparadas três formulações de IBP contendo 50mg, 100mg e 200mg do IFA. Posteriormente, a fase aquosa (8,8ml de água) foi então adicionada a mistura e os componentes da nanoemulsão foram novamente misturados em vórtex por 2 min e depois sonicados.

Em seguida, as preparações foram acondicionadas em frascos de vidro e estocadas à temperatura de 5 ± 3 ºC.

Para as NE contendo IBP+CRV nas concentrações de 50mg, 100mg e 200mg, foi avaliado o tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersão (PDI) sendo medidos por espalhamento dinâmico da luz a 173°, o potencial zeta foi medido por dispersão de luz eletroforética utilizando um Zetasizer Ultra (Malvern). As amostras foram diluídas com água ultrapura (1:9) e as medições foram realizadas em triplicata a 25ºC.

Para as NE brancas também foram analisados os valores de PDI, potencial zeta e tamanho médio para fins de comparação. Nesse estudo, após preparo, as formulações foram acondicionadas e armazenadas à temperatura de 5 ± 3 ºC. Em intervalos de tempo predeterminado (D1, D30 e D60 dias) após o preparo das NE, uma fração foi retirada para avaliação das propriedades físico-químicas.

Tabela 3 – Diferentes concentrações de nanoemulsões utilizadas, com dosagens de 50mg, 100mg e 200mg. Cada categoria inclui as respectivas substâncias e concentrações utilizadas.

Categoria	**Fase oleosa + Concentração**	**Fase aquosa + Concentração**	**Surfactantes + concentração**
NE Branca	CRV (300mg)	Água ultrapura (8,8ml)	Tween 80 (0,56g) e Span 80 (0,33g)
NE 50mg de IBP	CRV (300mg)	Água ultrapura (8,8ml)	Tween 80 (0,56g) e Span 80 (0,33g)
NE 100mg de IBP	CRV (300mg)	Água ultrapura (8,8ml)	Tween 80 (0,56g) e Span 80 (0,33g)
NE 200mg de IBP	CRV (300mg)	Água ultrapura (8,8ml)	Tween 80 (0,56g) e Span 80 (0,33g)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.3.2 Método Analítico

Um sistema cromatográfico líquido de ultra eficiência Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC-20 AD, injetor automático SIL-20AMT, forno de coluna CTO-20A, detector UV/Vis SPD-10A, controlador integrador automático CBM-20 computadorizado com software LC Solution foi usado. A fase estacionária foi composta por uma coluna analítica Phenomenex C18 (150mm, 4,6 mm x 5 µm). A fase móvel que proporcionou melhor seletividade ao método foi constituída por um método isocrático de uma mistura de acetonitrila:água acidificada a 0,1% com ácido fórmico (60/40; v/v). As análises foram realizadas em temperatura controlada (30°C), utilizando vazão de 0,7mL.min^{-1} e volume de injeção de 10µL. O detector UV foi ajustado em 230 nm.

4.3.3 Preparação de soluções estoque e soluções de trabalho

A solução estoque e soluções de trabalho dos padrões analíticos de IBP (1000µg/mL), CRV (1000µg/mL) e nanoemulsões (NE) foram preparadas em concentração a partir da fase móvel constituídas por acetonitrila (ACN):H2O (60:40, v/v).

4.3.4.1 Seletividade

Foram construídas duas curvas analíticas, uma com as soluções mistas de trabalho (contendo IBP + CRV) adicionadas à matriz e outra sem a presença da matriz (sem o IBP). Comparando as duas curvas analíticas, se forem paralelas, ou seja, se houver distinção entre as duas substâncias sem adição de novos picos, o método será considerado seletivo, pois não existem substâncias próximas do tempo de retenção. Imediatamente foram comparados os coeficientes angulares das duas curvas analíticas.

4.3.4.2 Linearidade

O parâmetro de linearidade para IBP (50,60,70,80,90,100 mg/ mL) e CRV (100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/ mL) foi avaliado a partir de soluções de trabalho em triplicatas, preparadas individualmente, diluídas na fase móvel da solução estoque. A linearidade pode ser comprovada através do coeficiente de determinação (R2) da

linha de calibração, refletindo o grau de correlação entre as variáveis X e Y, concentração e resposta, respectivamente. Se o valor de R^2 for superior a 0,999, o resultado está conforme (COSTA, 2003).

4.3.4.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração detectável, mas não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LOQ) representa a menor quantidade que pode ser determinada quantitativamente com confiabilidade adequada. Os valores de LOD e LOQ foram estimados com base na curva analítica, conforme as seguintes equações 6 e 7, respectivamente:

$$LOD = \frac{3{,}3\sigma}{S} \quad (6)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (7)$$

Onde σ é o desvio padrão residual da resposta e S é a inclinação da curva de calibração.

4.3.4.4 Precisão e Exatidão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Para repetibilidade, foram analisadas 3 réplicas de 6 determinações a 100% de IBP e concentração de CRV. A precisão intermediária foi avaliada em três níveis, com base na curva analítica (baixa – média – alta), com 3 réplicas e analisada em dias diferentes e por analistas diferentes. Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária foram avaliadas pela porcentagem do desvio padrão relativo, desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (RSD%).

A equação 4 representa a fórmula de determinar o valor de RSD (%), onde s diz respeito ao desvio-padrão do sinal obtido para cada uma das pesagens do padrão da impureza em estudo e M corresponde à média dos sinais respetivos.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S}{M}\ x\ 100 \quad (4)$$

4.3.4.5 Robustez

As validações do método de quantificação foram baseadas em critérios estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da determinação de parâmetros de seletividade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão/exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

Para avaliar a robustez do método foi utilizado o teste proposto por Youden e Steiner (1975). O teste de Youden constitui um método confiável para avaliação da robustez de métodos analíticos, através de um delineamento que envolve sete parâmetros analíticos, combinados em oito experimentos conforme mostra a Tabela 4 (INMETRO, 2010).

Tabela 4 - Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden. As condições analíticas em valores nominais são representadas por letras maiúsculas e as condições com pequena variação são representadas por letras minúsculas. Os resultados da análise são mostrados por letras de s a z.

Variáveis	**Experimentos**								**Variáveis dos fatores**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**Efeito**	**Nominal *(A)***	**Variação *(a)***
Concentração de ACN	A	A	A	A	a	a	a	a	A/a	60 %	58%
Percentual do modulador de pH	B	B	b	b	B	B	b	b	B/b	0,10%	0,05%
Temperatura do forno	C	c	C	c	C	c	C	c	C/c	30°C	35°C
Fluxo da fase móvel	D	D	d	d	d	d	D	D	D/d	0,7mL/min	0,6mL/min
Marca da ACN	E	e	E	e	e	E	e	E	E/e	MARCA-A	MARCA-B
Tipo de água	F	f	f	F	F	f	f	F	F/f	Osmose Reversa	Água Ultrapura
Detector (nm)	G	g	g	G	g	G	G	g	G/g	230	235
Resultado	**s**	**t**	**u**	**v**	**w**	**x**	**y**	**z**			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A influência de cada parâmetro na variação do resultado foi determinada comparando a média dos quatro valores correspondentes às condições nominais (letras maiúsculas) com a média dos quatro valores correspondentes às condições com pequena variação (letras minúsculas). Por exemplo, para avaliar o efeito da alteração da análise (A/a), os resultados das combinações s, t, u e v (com condições nominais para “A”) foram comparados com os resultados das combinações w, x, y e z

(com condições com pequena variação para “a”), conforme expresso na seguinte equação 5:

$$\frac{A}{a} = \frac{(s+t+u+v)}{4} - \frac{(x+y+w+z)}{4} \quad (5)$$

A Tabela 4 mostra quais fatores foram modificados para determinar a robustez. Os fatores nominais foram nomeados por letras maiúsculas de A a G e as variações por letras minúsculas correspondentes. Utilizando o teste de Youden é possível estabelecer com segurança os parâmetros que têm maior influência no resultado da análise e realizar um controle mais rigoroso sobre eventuais variações desses parâmetros que possam ocorrer durante uma análise.

4.3.4.6 Recuperação (Eficiência de Extração)

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. Este parâmetro é calculado comparando a resposta obtida para o analito adicionado à matriz, com a resposta obtida para o analito na concentração teórica na amostra. Embora valores elevados de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que esta recuperação seja de 100%, mas sim que seja consistente, precisa e reprodutível (Leadbetter, 2005; Brasil, 2017).

Para avaliar a recuperação foram utilizadas concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, conforme curva de calibração. Nos métodos bioanalíticos, a recuperação também deve ser avaliada para compostos utilizados como padrões internos. Aceita-se variação de até 15% no valor de recuperação determinado para os analitos de interesse. Para cálculos de recuperação de amostras derivadas durante o procedimento de extração, é necessário obter uma amostra padrão derivada (Peters, 2002)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação e caracterização de nanoemulsões

As nanoemulsões apresentaram tamanho médio de gotícula entre 143 e 376.5 nm, com PDI próximo de 0,3 e potencial zeta negativo (Tabela 5).

Os valores encontrados para o tamanho médio apresentaram aumento gradativo à medida que aumentava a concentração de ibuprofeno na nanoemulsão no dia D1, D30 e D60. Estudos anteriores indicam que o tamanho médio da nanoemulsão aumenta com o aumento da concentração na emulsão, devido ao aumento da viscosidade da fase interna, tornando mais difícil o rompimento das gotículas (JAFARI, HE, BHANDARI, 2006; RAMISETTY, SHYAMSUNDER, 2011; CANSELIER et al., 2012). Este comportamento pode ser observado em outros estudos com nanoemulsões, nos quais foram encontrados aumento no diâmetro das partículas ao longo dos dias (ANTÔNIO et al., 2017; DIEDRICH 2021). Em outros estudos envolvendo nanoemulsão realizados por DUARTE, et al., 2024, foram encontrados valores de tamanho de gotícula bem próximos a 187 nm no D60, apresentando proximidade entre os valores encontrados nesse estudo.

O potencial zeta também foi alterado com o aumento da quantidade de IBP, sugerindo uma interação do fármaco na superfície da nanoemulsão. Esta variação do potencial zeta entre a primeira análise e outras pode ser explicado pelo método de produção utilizado neste trabalho. O processo de sonicação pode afetar os componentes da nanoemulsão, induzindo a liberação de íons no sistema. Esta liberação de íons pode estar presente na interface da camada, induzindo mudanças no potencial zeta do sistema e justificando as diferenças encontrados entre os diferentes dias de análise. Este comportamento pode ser observado em outros estudos com nanoemulsões, nos quais após o primeiro momento de análise os valores do potencial zeta variaram, diferindo dos valores do primeiro dia (LI, 2016; ZAICHIK, 2020; GUERRA-ROSAS, 2016).

A coalescência e amadurecimento de Ostwald são dois dos principais fenômenos de desestabilização cinética de NEs e podem ser eficientemente avaliados pela alteração do tamanho, potencial Zeta e PDI. Foi encontrado um valor de PDI em torno de 0,3 ao longo dos 60 dias. Em outros estudos realizado por LIMONGI, 2024, utilizando a NE de CRV, foram encontrados valores bem próximos, mostrando um valor de PDI próximo a 0,3 ao longo de 90 dias. Nesse sentido, o PDI mostra o grau

de uniformidade do tamanho das gotas distribuição dentro do sistema (DANAEI, 2018). Valores de PDI de 0 e tamanhos de gotículas abaixo de 200 nm indicam uma partícula monodispersa. Um PDI < 0,5 indica uma distribuição ampla, e valores próximos a 1 indicam uma nanoemulsão altamente polidispersa com baixa estabilidade (SINGH, 2019; MOHD, 2020; DEGHIEDY, 2021). O valor do PDI é associado ao método de preparação, ao tipo de surfactante utilizado e à viscosidade do sistema. Nesse caso, os surfactantes utilizados foram o Tween 80 e Span 80, descritos como bons estabilizadores para o carvacrol.

Tabela 4a. Resultado dos parâmetros de estabilidade: índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e tamanho médio em D1.

Parâmetros de estabilidade no D1	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (PZ)	Tamanho Médio
Nanoemulsão Branca	0.2873	-36.41	143.7
Nanoemulsão 50mg	0.3298	-29.5	152
Nanoemulsão 100mg	0.2982	-23.13	170
Nanoemulsão 200mg	0.3254	-13.4	255.4

Tabela 4b. Resultado dos parâmetros de estabilidade: índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e tamanho médio em D30.

Parâmetros de estabilidade no D30	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (PZ)	Tamanho Médio
Nanoemulsão Branca	0.3596	-25.09	154
Nanoemulsão 50mg	0.3537	-18.82	152.7
Nanoemulsão 100mg	0.397	-22.05	172.9
Nanoemulsão 200mg	0.4598	-13.58	362.2

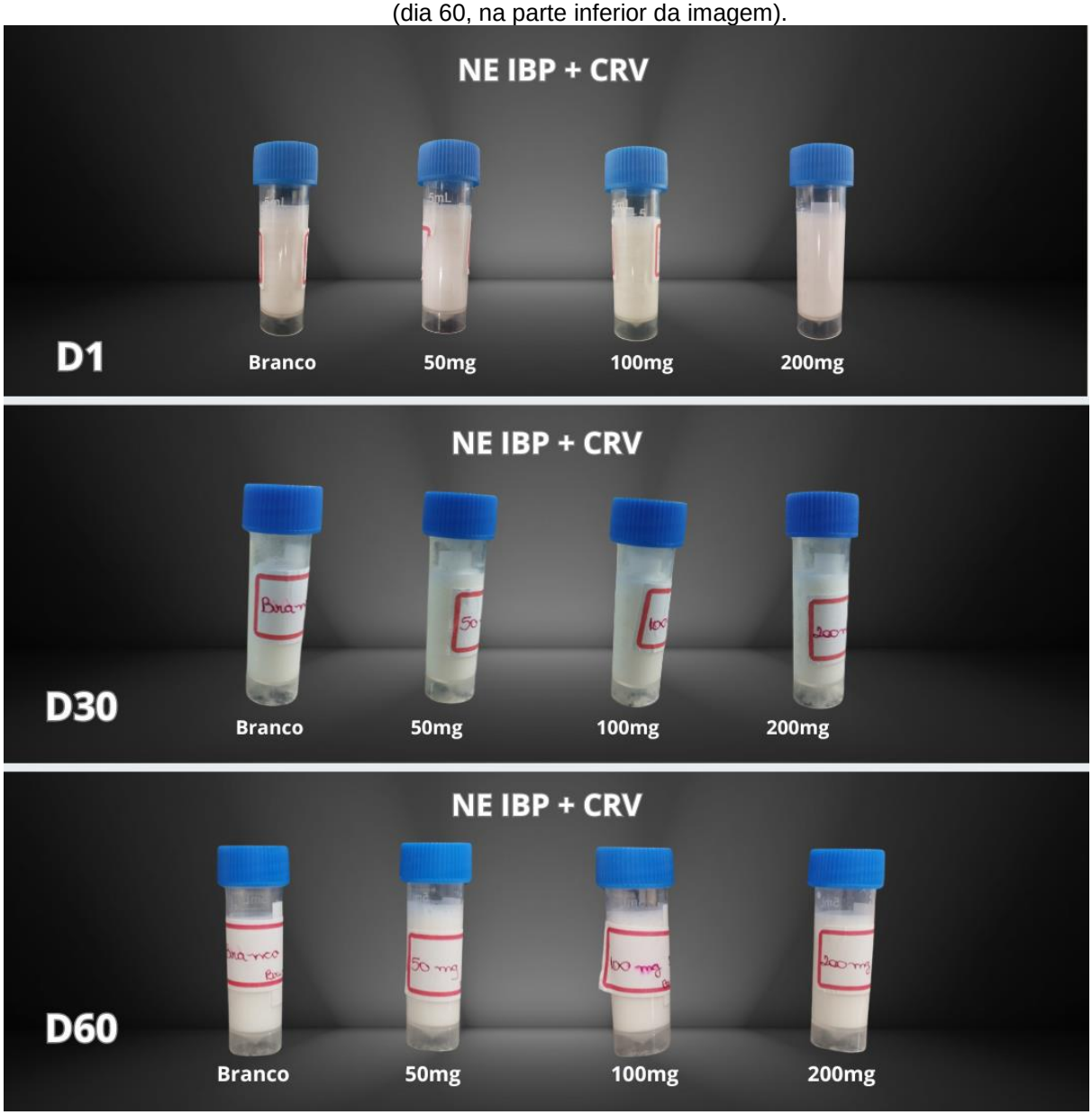
Tabela 4c. Resultado dos parâmetros de estabilidade: índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e tamanho médio em D60.

Parâmetros de estabilidade no D60	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (PZ)	Tamanho Médio
Nanoemulsão Branca	0.3549	-33.88	187.6
Nanoemulsão 50mg	0.3985	-24.65	238.5
Nanoemulsão 100mg	0.3875	-18.76	263.2
Nanoemulsão 200mg	0.415	-12.11	376.5

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Neste estudo, as NEs de IBP e CRV, foram produzidas usando um método de alta energia. É possível observar na Figura 6, que após 60 dias de formulação, as nanoemulsões mostraram-se macroscopicamente estáveis e preservando a aparência leitosa sem formação de creme ou separação de fases.

Figura 6: Aspecto visual da nanoemulsão contendo ibuprofeno e carvacrol após 60 dias de armazenamento a 4 °C. Pode-se observar o D1 (dia 1 na parte superior da imagem) e D60 (dia 60, na parte inferior da imagem).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.2 Validação do método analítico

A validação do presente método baseou-se nos critérios estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, determinando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão/exatidão e robustez. As melhores condições de separação para IBP e CRV foram obtidas utilizando uma

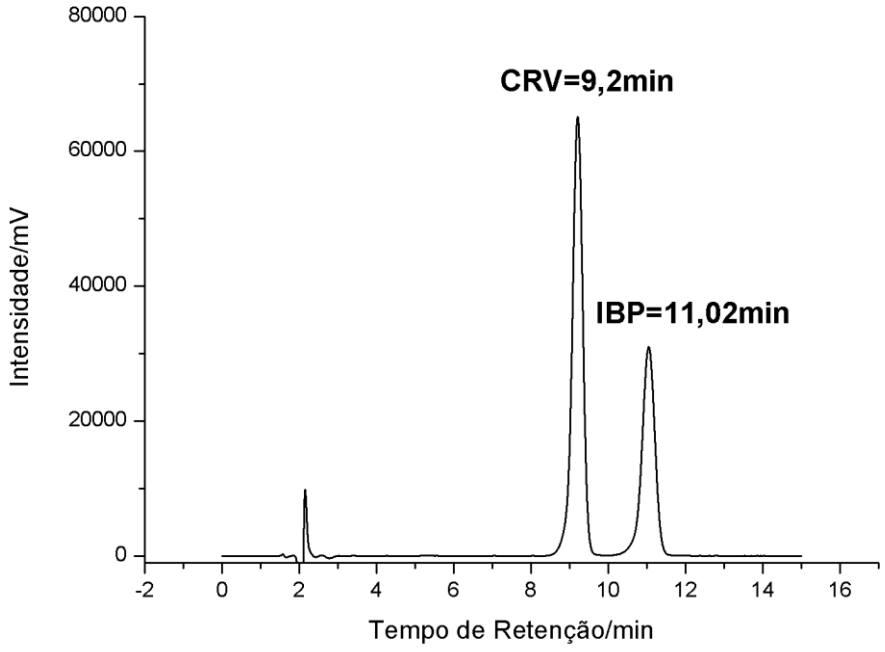
coluna C18 em modo de eluição isocrático com fase móvel composta por acetonitrila e solução de ácido fórmico a 0,1% em água (60:40).

5.2.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro que deve ser demonstrado e que depende do método analítico utilizado. Para os métodos, a seletividade cromatográfica é avaliada para garantir que o pico de resposta do analito (avaliado na característica do tempo de retenção) provém exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (THOMPSON et al, 2002).

Ao analisar os sinais cromatográficos com a matriz, observou-se uma distinção no tempo de retenção do CRV (9,2 min) e o IBP (11,02 min), ou seja, observa-se as duas substâncias com tempos de retenção diferentes e sem adição de novos picos, como mostra na figura 7. Portanto, o método foi seletivo, pois não existem substâncias próximas do tempo de retenção dos analitos, portanto, o método pode ser considerado seletivo.

Figura 7. *Cromatograma da análise de um nanossistema constituído por IBP + CRV, fase móvel sob fluxo de 0,7 mL/min, composta por H2O:ACN (40:60 v/v) com pH ajustado com ácido fórmico e a fase estacionária composta por um Phenomenex coluna analítica (150, 4,6 mm x 5 µm) e para monitoramento, um comprimento de onda de 230 nm foi utilizado para a análise*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.2.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada considerando seis níveis de concentração na faixa de 50 a 100 µg/mL de IBP e 100 a 200 µg/mL para CRV. A linearidade foi avaliada com base nas curvas analíticas obtidas para IBP e CRV. Um método analítico apropriado deve apresentar a melhor correlação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito na amostra.

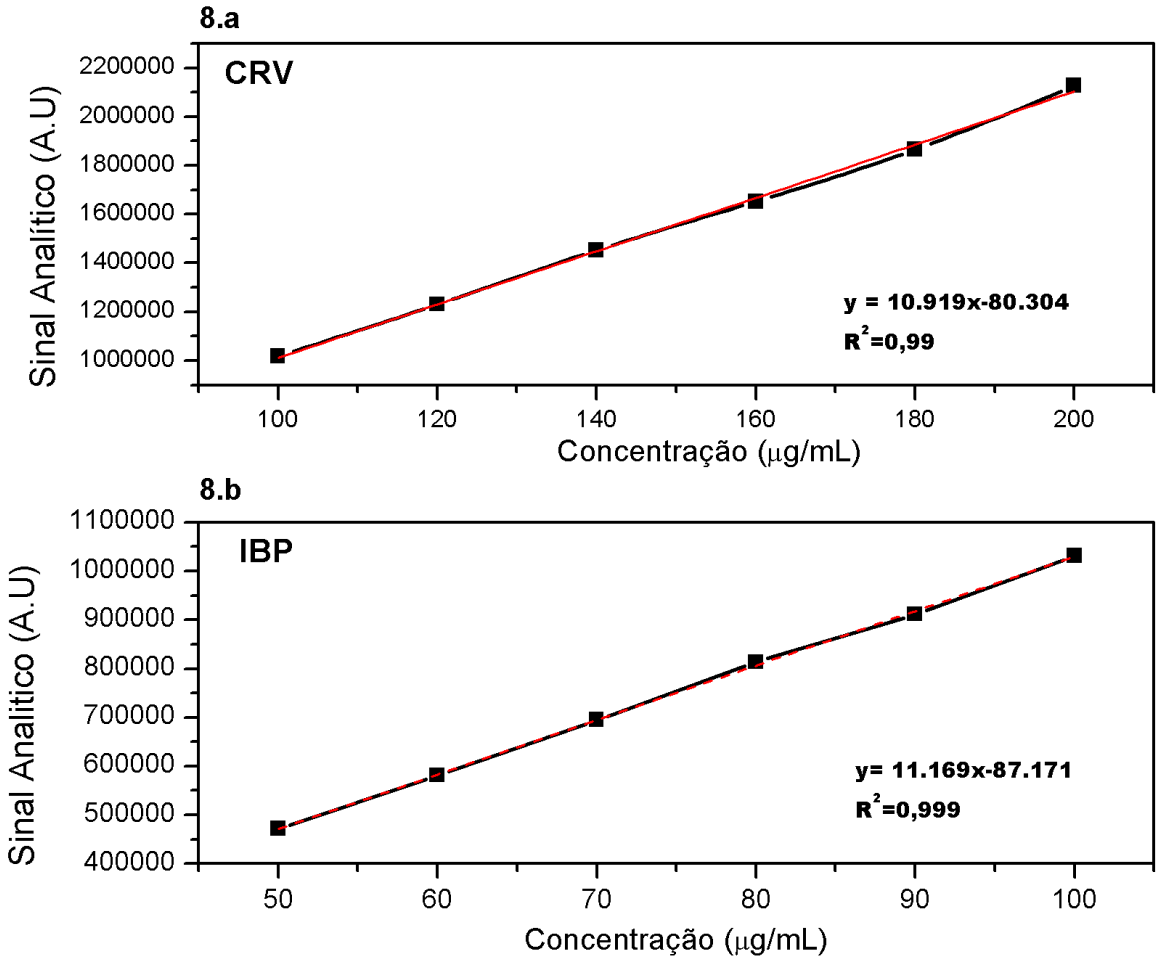
De acordo com os testes realizados, foi observado um coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 para o IBP e de 0,998 para o CRV, conforme demonstrado na tabela 6 e figura 8a e 8b, comprovando a satisfatoriedade do método para determinar IBP e CRV de acordo com o recomendado na resolução ANVISA nº. 166/22017.

Tabela 6 – Parâmetros estatísticos e analíticos referentes ao desenvolvimento da metodologia analítica para o IBP e CRV.

Parâmetros	IBP	CRV
Intervalo de concentração	50,0 – 100,0 mg/mL	100,0 – 200,0 mg/mL
Equação da reta	y= 11.169x-87.171	y = 10.919x-80.304
Coeficiente determinação (R^2)	0,999	0,9985
Limite de detecção (LD)*	3,54 mg/mL	8,64 mg/mL
Limite de quantificação (LQ)*	5,19 mg/mL	12,81 mg/mL

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024. *Nível de confiança de 95%;

Figura 8.a e 8.b - Representação gráfica da curva de calibração do CRV e IBP resultante da avaliação da linearidade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Na equação contida na figura 8.a e 8.b, o x representa a concentração em µg/mL e y o valor da absorbância. Foi obtido um coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,99, o que significa que existe uma resposta linear na faixa de concentração trabalhada (BRASIL, 2003). Assim, o resultado encontrado demonstra que as curvas analíticas podem ser utilizadas para quantificar a amostra contendo IBP e CRV, conferindo um método linear.

5.2.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

LOD e LOQ representam a concentração mais baixa na qual os analitos podem ser identificados e quantificados, respectivamente. LOD e LOQ foram estimados a partir do coeficiente angular do ajuste linear das curvas obtidas (ANVISA, 2017; INMETRO 2020).

O método demonstrou quantificar um valor praticamente 10 vezes menor em relação ao primeiro nível da curva analítica, isso demonstra que o método é capaz de

detectar e quantificar concentrações menores da substância de interesse que o ponto mais baixo de ambas as curvas analíticas.

Os valores de LOD para IBP foram 3,54 µg/mL e para CRV 8,64 µg/mL, enquanto o LOQ para IBP foi 5,19 µg/mL e 12,81 µg/mL para CRV, indicando que o método proposto era sensível para pequenas quantidades (ICH, 2005). Estudos anteriores mostraram valores de LOD para IBP na mesma faixa de concentração de 3,21 µg/mL (RODRIGUES, 2011). Outros estudos apresentaram valores de LOD para CRV de 8,6 µg/mL, mostrando proximidade entre os valores encontrados (HAJIMEHDIPOOR et al., 2010).

5.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada em três níveis, com base na curva analítica (baixo, médio e alto) e foi expressa através do Desvio Padrão Relativo (DPR%) conforme tabela 7.

Tabela 7 *– Precisões intermediária e repetitiva em baixa, média e alta concentração*

Analito	Nível	Intermediaria (DPR%)	Repetitividade (DPR %)
IBP	50,0	0,52	0,49
	70,0	0,11	0,23
	100,0	0,65	1,34
CRV	100,0	0,22	1,06
	140,0	0,19	1,04
	200,0	0,03	0,31

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024. *Nível de confiança de 95%;

A repetibilidade representa a precisão de múltiplas medições sob condições idênticas. Já a precisão intermediária avalia variações nas condições de operação, como dias, equipamentos ou analistas diferentes. Conforme RE 166/2017, os resultados obtidos para medições de precisão não podem apresentar variações, que podem ser expressas através do RSD% superior a 5%. Assim, todos os resultados encontrados indicam alta concordância e confiabilidade do método (RSD < 2%), refletindo a precisão e consistência das medições realizadas tanto entre diferentes analistas quanto em diferentes dias de análise.

5.2.5 Exatidão

Para exatidão, os resultados de concentração obtidos foram comparados com a concentração teórica de cada nível e avaliados pelos respectivos percentuais de recuperação (Tabela 8).

Tabela 8 – Exatidão e recuperação nos três níveis avaliados

Analito	Concentração Teórica	Concentração Experimental	DPR %	Recuperação (%)
IBP	50,0	50,69	0,51	101,38
	70,0	70,86	0,94	101,22
	100,0	101,11	0,64	101,11
CRV	100,0	99,15	1,47	99,15
	140,0	140,35	1,06	100,0
	200,0	201,13	0,90	100,0

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os resultados obtidos a partir das concentrações previstas dos três níveis obtiveram valores muito próximos do valor de referência de cada nível correspondente, o que indica uma boa capacidade do método analítico em estimar com precisão a concentração do analito na amostra. Além disso, os valores obtidos para RSD% indicam que os valores estão próximos da média, o que indica boa precisão do método. De acordo com a RDC 166/2017, o critério de aceitação da recuperação obtida para que o método seja considerado preciso e específico é de ± 2,0% (BRASIL, 2017).

5.2.6 Robustez

A robustez indica a capacidade do método analítico de suportar pequenas variações nas condições analíticas. A metodologia proposta por Youden e Steiner (YOUDEN E STEINER, 1975) foi utilizada para verificar o efeito de cada variação na absorção de IBP e CRV (Tabela 8), através de um planejamento experimental de combinação fatorial. Os resultados dos testes das combinações de variações estão descritos na Tabela 9 através do tempo de recuperação e retenção.

Tabela 9 – Efeito dos parâmetros analíticos na recuperação e no tempo de retenção na avaliação da robustez do método cromatográfico desenvolvido para quantificação do IBP e CRV

Variáveis	Níveis	Recuperação		Tempo de Retenção	
		IBP	*CRV*	*IBP*	*CRV*

Concentração de ACN	60% (**A**) 58% (**a**)	-0,73	-0,51	-1,48	-0,99
Percentual do modulador de pH	0,10% (**B**) 0,05% (**b**)	-0,08	3,97	0,98	0,76
Temperatura do forno	30°C (**C**) 35°C (**c**)	-2,11	-0,62	-1,38	-1,04
Fluxo da fase móvel	0,7 mL/min (**D**) 0,6 mL/min (**d**)	-3,64	-3,65	-0,78	-0,69
Marca da ACN	Marca-A (**E**) Marca-B (**e**)	-1,49	1,64	-0,13	-0,09
Tipo de água	Osmose Reversa (**F**) Água ultrapura (**f**)	1,26	2,32	-0,48	-0,24
Detector (nm)	230 nm (**G**) 235 nm (**g**)	29,99	74,71	-1,13	-0,89

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Como pode ser observado na Tabela 8, tanto para IBP quanto para CRV o maior efeito foi G/g = 29,99 (IBP) e 74,71 (CRV), referente ao comprimento de onda de absorção UV/Vis, que teve maior influência no resultado referente à recuperação desses analitos. Assim, ao comparar a absorção do IBP em 230 nm, este comprimento de onda na região UV/Vis do fármaco tem um efeito positivo em termos de aumento da recuperação quando comparado à absorção em 235 nm, indicando que a absorção em 230 nm proporciona um sinal analítico mais forte, devido a uma melhor correspondência entre a energia do fóton e a transição eletrônica específica do analito. Todas as outras variáveis têm pequena influência na robustez do método.

5.3 Aplicabilidade do método

Para o IBP, a taxa média de recuperação foi de 94,85% na concentração de 10 mg/mL e para o CRV, a taxa média de recuperação foi de 88,57% na concentração de 30 mg/mL. As taxas de recuperação são apresentadas na Tabela 10, que verifica, através dos resultados obtidos, a precisão do método utilizado. As taxas de recuperação obtidas estão dentro da faixa exigida pela ANVISA (70-120%), o que comprova a precisão do método, deixando os resultados dentro do limite de aceitabilidade. Estudos anteriores realizados por Dantas (2021), obtiveram dados semelhantes, nos quais foi encontrada uma taxa de recuperação de 83,97% e um conteúdo de carga medicamentosa de 4,29 mg/mL de CRV. Em outro estudo realizado por Khan (2019), obteve uma recuperação de fármaco próxima a 80% do CRV em nanoemulsão por ultrassom e homogeneização pelo método de alta pressão.

Tabela 10. Resultado da taxa de recuperação obtida em triplicata para a nanoemulsão branca e nanoemulsão contendo 50mg de IBP e CRV no D1.

Amostra D1	Concentração teórica (mg mL^{-1})		Concentração experimental (mg mL^{-1})		Taxa de Recuperação (%)	
	IBP	CRV	IBP	CRV	IBP	CRV
Nano-Branca	-	30,00	-	21,86±0,71	-	72,86
Nano-100	10,00	30,00	9,48±0,46	26,57±1,56	94,85%	88,57%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho provou ser o primeiro estudo a desenvolver uma nanoemulsão pelo método de alta energia contendo ibuprofeno e carvacrol e em seguida realizar a validação através do método de quantificação simultânea de IBP e CRV por meio da técnica UPLC. A validação do método cromatográfico foi estabelecida e todos os critérios de aceitação (ANVISA - RDC 166/2017) foram atendidos. Foi possível obter boa linearidade dos analitos, bem como precisão (repetibilidade e precisão intermediária) compatível com padrões nacionais (CV%< 10%) em todas as concentrações avaliadas. Os valores relativos do desvio padrão (abaixo de 2-5%) demonstraram que a variação dos resultados é pequena em relação à concentração média, o que é viável em termos de precisão analítica. A análise de robustez indicou uma resposta robusta do analito, com alta concentração prevista (CP) e tempo de retenção adequado, além de indicar boa separação cromatográfica e quantificação precisa do analito. Além disso, após 60 dias de formulação, as nanoemulsões mostraram-se macroscopicamente estáveis, preservando a aparência leitosa sem formação de creme ou separação de fases. Dessa forma, a nanoemulsão contendo ibuprofeno e carvacrol mostrou-se promissora, destacando-se pela estabilidade e capacidade de manter as propriedades dos compostos ativos ao longo do tempo. O método validado para quantificação dos ativos se mostrou robusto e preciso, reforçando seu potencial de aplicação em processos industriais e pesquisas futuras, especialmente no aprimoramento de formulações farmacêuticas que visam maior biodisponibilidade e menor toxicidade dos fármacos.

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jul. 2017.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009.

ACEVEDO, M. D. R. B.; ANCHANTE, D. L. L.; JHONG, J. J. A. P.; CENTENO, J. F. P. Perfil de dissolução de comprimidos de ibuprofeno com problemas de bioequivalência em meio biorelevante formado por lauril sulfato de sódio. Brazilian Journal of Health Review, v. 4, n. 3, p. 10662–10675, 2021. DOI: https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-085.

ANTÔNIO, E. et al. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. Materials Science and Engineering: C, v. 71, p. 156–166, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.080.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils–a review. Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BEZERRA, T. P. W.; BANDEIRA, A. R. G.; LIMA, S. H. P.; ANDRADE, P. L. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. Research, Society and Development, v. 11, n. 14, e99111436115, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36115.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993. DOI: https://doi.org/10.1002/jps.2600821102.

CARROUEL, F. et al. Nanopartículas como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e remineralizantes em cosméticos para cuidados orais: uma revisão da situação atual. Nanomaterials, v. 10, n. 1, p. 140, 2020.

CHEN, F. et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. The Plant Journal, v. 66, n. 1, p. 212-229, 2011.

CHUNG CHOW CHAN, P. D. Potency Method Validation. In: Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Y. C. L. Chung Chow Chan, Herman Lam, Xue-Ming Zhang, Editor. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 11-26.

CONTRERAS-RAMÍREZ, J. I. et al. Organogel-based emulsified systems, food applications, microstructural and rheological features: A review. Biointerface Research in Applied Chemistry, v. 12, n. 2, p. 1601-1627, 2022.

DALTIN, D. Tensoativos: Química, propriedade e aplicações. 3. ed. Brasil: Blucher, 2020.

DEGHIEDY, N. M., ELKENAWY, N. M., ABD EL-REHIM H. A. (2021) Fabricação assistida por radiação gama de nanoemulsão de tomilho revestida com bioativo: Uma nova abordagem para melhorar a estabilidade, eficácia antimicrobiana e antibiofilme. J Food Eng
304:110600. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110600.

DIAS, B. D. P. et al. A nanotecnologia no brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. Química Nova, v. 44, p. 1084-1092, 2021.

DUARTE, A. B. S., PEREZ-CASTILLO, Y., DA NÓBREGA ALVES, D. *et al.* Atividade antifúngica contra *Candida albicans* de nanoemulsão carregada com metil 3,5-dinitrobenzoato. *Braz J Microbiol* **55** , 25–39 (2024). https://doi.org/10.1007/s42770-023-01214-9.

GUSEV, I.; HUANG, X.; HORVÁTH, C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, v. 855, n. 1, p. 273-290, 1999.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 16, n. 5, p. 821. DOI: 10.18433/J3VW2F.

HAZAFA, A. et al. Nano-biopesticides as an emerging technology for pest management. In: RANZ, E.R.R. Insecticides: Impact and Benefits of Its Use for Humanity. IntechOpen, 2022.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 25, n. 1, p. 3–14, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Brasil). Avaliação da conformidade. 6. ed. 2015. Acesso em: 03 ago. 2024.

KOROLEVA, M.Y.; YURTOV, E.V. Ostwald ripening in macro-and nanoemulsions. Russian Chemical Reviews, v. 90, n. 3, p. 293, 2021.

KULKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. Química Nova, v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.

KYSELOVIČ, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ibuprofen lysinate in comparison to ibuprofen acid for acute postoperative dental pain. Pain and Therapy, v. 9, n. 1, p. 249–259, 2020.

LA ROCA, M. F. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. Revista Brasileira de Farmácia, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LIMA, J. C. Efeitos adversos associados ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs): uma revisão sistemática. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento, v. 15, n. 5, p. 177-191, 2021.

LIMONGI, R.S; OPRETZKA, L. C. F; MORAIS, M. C.; MELO, C. O; OLIVEIRA, B. E. G; SOUSA, D. P; VILLARREAL, C. F; OLIVEIRA, E. E. Nanoemulsion Improves the Anti-Inflammatory Effect of Intraperitoneal and Oral Administration of Carvacryl Acetate. Pharmaceuticals 2024, 17, 17. https://doi.org/10.3390/ph17010017.

LUNA-HERRERA, J. et al. Nanopartículas como transportadores de fármacos: uma ferramenta promissora contra a tuberculose. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, v. 38, p. 143-152, 2021.

LYRA, M.A.M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 5, p. 784-794, 2022.

MELO, L. G. A. et al. Automedicação: o uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais e suas implicações para saúde. Revista Científica Faculdade Atenas, v. 11, n. 4, p. 12-21, 2020.
MOHD NARAWI, M. M., CHIU, H. I., YONG, Y. K., MOHAMAD ZAIN, N. N., RAMACHANDRAN, M. R., THAM, C. L., SAMSURRIJAL, S. F., LIM, V. (2020) Nanoemulsão biocompatível carregada com óleo de noz-moscada como fito-repelente. Front Pharmacol 11:214. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00214.

MONTERO, O. et al. Effect of different broad waveband lights on membrane lipids of a cyanobacterium, Synechococcus sp, as determined by UPLC-QToF-MS and vibrational spectroscopy. Biology, v. 5, n. 2, p. 22, 2019.

OTAVIANO, C.M. Desenvolvimento e otimização de método para extração do inseticida fipronil em cascas de ovos. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) Universidade Federal de Uberlândia, 2022. Disponível em: https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/34697.

PORTO, A. S. et al. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: Estudo de síntese e toxicidade. Revista Fitos, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020.

SOUZA, R. L., DANTAS, A. G. B., MELO, C. O., FELÍCIO, I. M., OLIVEIRA, E. E. (2022) Nanotecnologia como ferramenta para melhorar a atividade biológica do carvacrol: uma revisão. J Drug Deliv Sci Technol 76:103834. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103834.