

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Óleo essencial de casca-preciosa (*Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez): validação de metodologia bioanalítica e estudo de permeação cutânea *in vitro*

TAINÁ KREUTZ

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Óleo essencial de casca-preciosa (*Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez): validação de metodologia bioanalítica e estudo de permeação cutânea *in vitro*

Dissertação apresentada por **Tainá Kreutz** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Cassel
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Kreutz, Tainá
Óleo essencial de casca-preciosa (Aniba canelilla (H. B. K.) Mez): validação de metodologia bioanalítica e estudo de permeação cutânea in vitro / Tainá Kreutz.
-- 2017.
122 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Aniba canelilla. 2. 1-nitro-2-feniletano. 3. metileugenol. 4. validação bioanalítica. 5. HS-SPME-GC-FID. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606), no Laboratório de Toxicologia (605) e na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento do CNPq e da CAPES. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jaime e Cleci, e ao meu irmão Bruno, pelo carinho, amor e incentivo, pela formação que me proporcionaram e pelo apoio incondicional em todos os momentos, desde a mudança do Mato Grosso até o término do mestrado.

À Lígia Freitas e Eutalita Bezerra, pela paciência, carinho nos momentos agradáveis e difíceis, estímulo e conversas engrandecedoras.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo distantes ou ausentes, acompanharam com zelo esses anos de estudo e dedicação.

À minha orientadora, Prof. Dra. Letícia Scherer Koester, pela imensa oportunidade. Agradeço grandemente por ter me recebido, auxiliado e confiado em meu trabalho. Obrigada por sempre estar disponível a questionamentos, orientando com sabedoria, objetividade e paciência durante esses anos.

Ao Prof. George González Ortega pelos momentos de descontração, pelas horas despendidas e paciência em passar seus conhecimentos que tanto me agregaram e me tornaram mais crítica com relação ao trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Valdir Florêncio da Veiga Júnior pela doação de matéria-prima, auxílio com as correções e colaboração no trabalho.

À Profa. Renata Pereira Limberger e aos colegas do Laboratório de Toxicologia pelas conversas, apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho e por terem cedido espaço em seu laboratório para a realização deste trabalho.

À Letícia Lucca, que me ajudou várias vezes com a técnica, sempre disposta a sanar minhas dúvidas e questionamentos.

Aos meus colegas e amigos, Kleyton, Mariana, Jonathan, Lucélia e Flávia, por todos os momentos que me acolheram com palavras de apoio, pela disposição em ajudar e pela amizade dentro e fora do laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, pelas risadas, amizade e companheirismo durante todo esse tempo.

Às bolsistas Tatiane Soldi, Bárbara Santos, Caroline Gentz e Juliane Bica, pela dedicação e auxílio, de alguma forma, no decorrer dessa caminhada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS que contribuíram para minha formação.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, órgão financiador da bolsa de estudos recebida durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez é uma planta aromática proveniente da região amazônica cujo óleo essencial apresenta como componentes majoritários o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol. Apesar das atividades antifúngicas e anti-inflamatórias cientificamente comprovadas e do uso popular do óleo para o tratamento de dermatites, acnes e feridas, não existe até o momento um estudo que verse sobre a quantificação desses compostos na pele. O objetivo deste trabalho foi a validação de um método bioanalítico otimizado por microextração em fase sólida no modo *headspace* em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (HS-SPME-GC-FID) para a determinação do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial em diferentes amostras de estudo de permeação cutânea *in vitro*. Uma metodologia foi desenvolvida e validada por HS-SPME-GC-FID. A faixa da curva de calibração foi de 2,08 - 207,87 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o 1-nitro-2-feniletano e de 0,40-40,41 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o metileugenol. A presença de matriz e as características intrínsecas da metodologia de HS-SPME requereram uma transformação da curva de calibração. A transformação logarítmica (Log_{10}) foi então aplicada aos dados e os resultados apresentaram homocedasticidade, resíduos dispersos, coeficiente de determinação ($r^2 > 0,99$) e recuperação adequados. Estudos de permeação cutânea foram realizados em células de Franz com diferentes quantidades (20, 100 e 200 μL) de óleo essencial de *A. canelilla* para avaliar o perfil de permeação e retenção em pele de orelha suína e fluido receptor. A análise das amostras nas condições validadas mostrou uma grande permeação e retenção dos compostos na seguinte ordem: fluido receptor >> derme >> epiderme >> estrato córneo. Verificou-se um aumento progressivo e dependência na retenção com base na quantidade aplicada no compartimento doador e grande retenção principalmente no fluido receptor e derme, resultado este compatível com as características físico-químicas de $\text{Log } P$, afinidade ao ambiente hidrofílico e lipofílico, tamanho e peso molecular do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol. Em conclusão, o método proposto por HS-SPME-GC-FID para quantificar os compostos majoritários do óleo essencial de *A. canelilla* em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor foi seletivo, preciso, exato e adequado, e pode ser utilizado em análises futuras.

Palavras-chave: *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-feniletano, metileugenol, validação bioanalítica, HS-SPME-GC-FID.

ABSTRACT

“Precious-bark” essential oil (*Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez): Bioanalytical method validation and *in vitro* cutaneous permeation study

Aniba canelilla (H.B.K.) Mez is an aromatic plant from the Amazon region whose essential oil has 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol as major compounds. Despite of the scientifically proved antifungal and anti-inflammatory activities and the popular use of oil for the treatment of dermatitis, acnes and wounds, there is no study up to date about the quantification of these compounds in skin samples. The aim of this study was the validation of an optimized bioanalytical method by solid phase microextraction on headspace mode in gas chromatograph with flame ionization detector (HS-SPME-GC-FID) for the determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from the essential oil in different samples of *in vitro* cutaneous permeation study. A methodology was developed and validated by HS-SPME-GC-FID. The ranges of calibration curves were 2.08 - 207.87 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 1-nitro-2-phenylethane and 0.40 - 40.41 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for methyleugenol. The presence of matrix and the intrinsic characteristics of the HS-SPME methodology required a transformation to the calibration curves. The logarithmic transformation (Log_{10}) was then applied to the data and the results showed homoscedasticity, dispersed residues, and adequate coefficient of determination ($r^2 > 0.99$) and recovery. Skin permeation studies were performed on Franz cells with different amounts (20, 100 and 200 μL) of *A. canelilla* essential oil to evaluate the skin permeation and retention profile in porcine ear skin and receptor fluid. The analysis of the samples under the validated conditions showed a high permeation and retention of the major compounds in the following order: receptor fluid >> dermis >> epidermis >> stratum corneum. A progressive increase and retention dependence were observed based on the amount applied in the donor compartment, and large retention mainly on the receptor fluid and dermis was observed, in accordance with the physicochemical characteristics of Log P, affinity to the hydrophilic and lipophilic environment, size and molecular weight of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol. In conclusion, the method proposed by HS-SPME-GC-FID to quantify the major compounds of *A. canelilla* essential oil in porcine ear skin and receptor fluid samples was selective, accurate, precise and adequate, and can be used in future analyzes.

Keywords: *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-phenylethane, methyleugenol, bioanalytical validation, HS-SPME-GC-FID.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Árvore e folhas da <i>Aniba canelilla</i>	32
Figura 2.	Estrutura química dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano e metileugenol presentes no óleo essencial de casca-preciosa.....	33
Figura 3.	Biogênese do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir da fenilalanina através da via do ácido chiquímico.....	34
Figura 4.	Dispositivo manual de microextração em fase sólida	38
Figura 5.	Principais modos realizados por microextração em fase sólida: extração direta, extração via <i>headspace</i> , extração envolvendo proteção por membrana.....	39

CAPÍTULO II

Figura 1.	Chemical structures of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol.....	62
Figura 2.	3D response surface plot showing the effects of temperature of heating bath, fiber exposure time and ionic strength effect on NP and ME areas	75
Figura 3.	Scatterplot of concentration versus peak area, normal probability plot of standardized residual, and standardized residuals versus concentration of non-transformed and transformed calibration curve data of NP in PES matrix under ordinary least square regression method.....	79
Figura 4.	Scatterplot of concentration versus peak area, normal probability plot of standardized residual, and standardized residuals versus concentration of non-transformed and transformed calibration curve data of ME in PES matrix under ordinary least square regression method.....	80

Figura 5.	Specificity of receptor fluid, tapes from tape-stripping with porcine stratum corneum, epidermis and dermis, compared to a reference solution of EOAC with NP and ME at 103.93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 20.20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.....	81
Figura 6.	Cumulative amount permeated of NP and ME on stratum corneum, epidermis, dermis and receptor fluid from different amounts applied on Franz cell.....	85
Figura 7.	Skin retention profile presented as cumulative amount permeated of NP and ME from EOAC in receptor fluid at different applied quantities in Franz cell donor compartment: 20 μL ; 100 μL ; and 200 μL	86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Principais fibras de microextração em fase sólida disponíveis no mercado.....	41
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Independent and dependent variables used in 3 ³ Box–Behnken design to investigate and optimize the main compounds extracted from <i>Aniba canelilla</i> essential oil.....	66
Tabela 2. Compounds identified in the EOAC by Linear Retention Indices.....	71
Tabela 3. ANOVA from Box Behnken 3 ³ factorial design for NP and ME peak areas.....	73
Tabela 4. Results for intra-day precision and inter-day precision for 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol.....	82
Tabela 5. Results for recovery from 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol in different matrices with non-transformed and transformed Log-Log data applied to ordinary least square linear regression.....	83
Tabela S1. Description of Box Behnken 3 ³ experimental design and its predicted and observed responses for NP and ME peak areas.....	88
Tabela S2. Fitting models applied to the calibration curve of 1-nitro-2-phenylethane in porcine ear skin matrix.....	89
Tabela S3. Fitting models applied to the calibration curve of methyleugenol in porcine ear skin matrix.....	90

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVOS	23
CAPÍTULO I – Revisão da Literatura	27
TERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA	29
ÓLEO ESSENCIAL DE CASCA-PRECIOSA	31
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPME	37
DESENHO EXPERIMENTAL	43
VALIDAÇÃO BIOANALÍTICA E TRATAMENTO DE DADOS	46
CAPÍTULO II - Determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from <i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez essential oil in skin permeation samples by an optimized headspace solid-phase microextraction gas chromatography with flame ionization detector	49
DISCUSSÃO GERAL	99
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
REFERÊNCIAS GERAIS	111

A utilização de plantas medicinais pelo ser humano é uma prática comum adotada há milhares de anos com o intuito de tratar inúmeras doenças. A população brasileira apresenta uma longa tradição no uso de plantas medicinais, ascendendo o interesse no estudo de plantas medicinais nativas e seus princípios ativos (DUTRA et al., 2016).

Dentre os produtos que podem ser aproveitados de uma planta, temos os óleos essenciais, provenientes de metabolismo secundário. São compostos oleosos aromáticos líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos, geralmente de densidade menor do que a da água, podendo ser sintetizados em diferentes órgãos da planta tais como flores, troncos, folhas, cascas, sementes e raízes (BASER; BUCHBAUER, 2010; BILIA et al., 2014; ASBAHANI et al., 2015).

A *Aniba canelilla* (Kunth) Mez, conhecida como casca-preciosa, é uma planta aromática abundante na região Amazônica, cujo óleo essencial possui como compostos majoritários o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol (LIMA et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2010). Estudos têm demonstrado que esses dois compostos voláteis apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (CARLINI; DALLMEIER; ZELGER, 1981; YANO et al., 2006; LIMA et al., 2009; VALE et al., 2013; XIMENES et al., 2013).

Tendo em vista que a terapia tópica é bastante atrativa e acessível à administração de substâncias, promovendo vantagens quanto à biodisponibilidade, efeitos secundários reduzidos, melhor adesão pelo paciente e possibilidade de ação terapêutica específica no local acometido (ASBILL; MICHNIAK, 2000; BOLZINGER et al., 2012; MONTENEGRO et al., 2016), suscita-se o interesse no emprego do óleo essencial de *A. canelilla* para o tratamento de processos inflamatórios tópicos.

Com base nos aspectos relatados, os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma metodologia bioanalítica otimizada empregando-se HS-SPME-GC-FID para a quantificação dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano e metileugenol do óleo essencial de casca-preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez) a partir de amostras provenientes de estudo de permeação e retenção em células de

difusão *in vitro* do tipo Franz, e avaliar a permeação cutânea *in vitro* desses compostos a partir da aplicação do óleo essencial de casca-preciosa sobre pele de orelha suína.

Esta dissertação está estruturada em dois capítulos:

· O capítulo I apresenta uma revisão de literatura sobre as temáticas tratadas ao longo do trabalho, sendo estes: terapia anti-inflamatória tópica, óleo essencial de casca-preciosa, microextração em fase sólida, desenho experimental, validação bioanalítica e tratamento de dados;

· O capítulo II aborda os resultados experimentais atinentes à validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano e metileugenol do óleo essencial de casca-preciosa a partir de estudos de permeação e retenção cutânea em pele de orelha suína, empregando-se células de difusão *in vitro* do tipo Franz. Este estudo está apresentado na forma de um manuscrito submetido à publicação em periódico de circulação internacional.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia bioanalítica para quantificação dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano e metileugenol do óleo essencial de casca-preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez) a partir de estudos de permeação e retenção cutânea em pele de orelha suína em células de difusão *in vitro* do tipo Franz.

Objetivos Específicos

- Desenvolver um método seletivo para identificação e quantificação do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de casca-preciosa por microextração em fase sólida no modo *headspace* em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (HS-SPME-CG-FID);
- Otimizar os parâmetros de extração de ambos compostos por HS-SPME através de desenho experimental do tipo Box Behnken 3³;
- Selecionar dentre os diferentes modelos matemáticos de adequação à curva de calibração o que melhor se ajusta aos dados obtidos na validação;
- Validar um método bioanalítico para a determinação do teor do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de *A. canelilla* por HS-SPME-GC-FID em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor provenientes de estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* em células de difusão do tipo Franz;
- Investigar o perfil de permeação e penetração cutâneo *in vitro* do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de casca-preciosa em células de difusão do tipo Franz.

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

TERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

A pele é um órgão extenso que recobre toda a superfície de aproximadamente 2 m² do corpo, constituída por uma multiplicidade de células que interagem entre si de forma harmoniosa com o intuito de manter a homeostase do organismo (GOLDSMITH, 1990; WILLIAMS; KUPPER, 1996; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014). É uma estrutura complexa de tecidos dispostos e relacionados cujas funções se baseiam na defesa, proteção, renovação e reparação tecidual (CORRÊA, 2012).

É composta de três camadas principais, cada qual com propriedades diversas atreladas à funcionalidade do órgão, sendo estas a epiderme avascular, derme, e hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo (SELZER et al., 2013).

A epiderme é a camada mais superficial da pele e possui espessura entre 50 e 100 µm. Essa camada confere à pele textura e umidade, além de contribuir para a pigmentação cutânea (BAUMANN, 2009; SELZER et al., 2013). A epiderme não apresenta vasos sanguíneos próprios e o aporte de elementos nutritivos é proveniente do plasma circulante nos espaços intercelulares. É constituída por células epiteliais estratificadas achatadas justapostas e encontra-se sobre a derme (CORRÊA, 2012). A epiderme é subdivida em camadas ou estratos, denominados basal ou germinativa, malpighiana ou espinhosa, granulosa, córnea e lúcida. Ademais, ainda contém quatro tipos celulares, sendo estes os queratinócitos, melanócitos, células de *Langerhans* e células de *Merkel* (LEONARDI; SPERS, 2015). As células têm origem na camada basal germinativa e, na medida em que envelhecem, tornam-se mais achatadas e passam a produzir e acumular queratina. Quando as células mais superficiais estão completamente queratinizadas, passam a constituir um revestimento resistente ao atrito e impermeável à água, chamado de estrato córneo (BAUMANN, 2009).

O estrato córneo é a porção mais externa da epiderme, em contato direto com o ambiente, composta por células queratinizadas anucleadas, achatadas, desidratadas e com aspecto de finas lâminas superpostas, detendo em torno de 10 a

20 µm de espessura (CORRÊA, 2012; SELZER et al., 2013). Esse arranjo de lâminas justapostas verticais permite que essa camada seja relativamente impermeável (LEONARDI; SPERS, 2015), atuando como barreira, prevenindo perda de água transepidermal e impedindo a absorção de materiais indesejáveis (BAUMANN, 2009).

A derme é a camada intermediária da pele, possuindo cerca de 2 a 5 mm de espessura, sendo a porção que detém maior volume dentre as demais camadas. É constituída por células epiteliais sobrepostas e fibrilas de colágeno cujas funcionalidades são fornecer sustentação, e também por tecido conjuntivo elástico, conferindo elasticidade e flexibilidade à pele (BENSON; WATKINSON, 2012; CORRÊA, 2012; MOSS; GULLICK; WILKINSON, 2015). A derme é composta por uma pequena população de células, predominantemente fibroblastos, que produzem os componentes do tecido conjuntivo (colágeno, elastina, proteínas de matriz e enzimas). Ademais, também se encontram na derme as células envolvidas na resposta imunológica e inflamatória, tais como mastócitos, leucócitos, linfócitos e macrófagos (BAUMANN, 2009; CEVC; VIERL, 2010; BENSON; WATKINSON, 2012). Várias estruturas e apêndices também estão contidos ou originam-se na derme, tais como vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, e terminações nervosas. Devido à sua estrutura, a derme não é uma barreira impeditiva à permeação de fármacos e agentes externos, mas pode reduzir a permeação de compostos muito lipofílicos para tecidos mais profundos (BENSON; WATKINSON, 2012; LEONARDI; SPERS, 2015).

A camada mais profunda da pele é composta pela hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo, formada por tecido conjuntivo frouxo e adipócitos. Essa camada fornece sustentação e união às camadas superiores, protege contra choques mecânicos, promove isolamento térmico e possui ainda reserva energética. Parte das glândulas sudoríparas e folículos pilosos também podem localizar-se na hipoderme (CORRÊA, 2012; MOSS; GULLICK; WILKINSON, 2015).

Distúrbios da pele podem ocorrer por diversos fatores, como por desequilíbrio de comunicação entre as células, infecções, neoplasias e ainda respostas imunológicas. A inflamação é um desses distúrbios e consiste em uma dinâmica

vascular e uma resposta reflexiva celular do organismo, ou seja, é um mecanismo protetivo cujo intuito é remover o estímulo lesivo ou invasivo. O processo inflamatório não é um evento único e envolve uma grande variedade de mediadores inflamatórios, citocinas, eicosanoides, enzimas, radicais de oxigênio e sistema complemento (BAUMANN, 2009). Tendo em vista essas inúmeras circunstâncias que podem gerar desordem na pele, deve-se considerar também que, por vezes, existe a necessidade de uma intervenção terapêutica para que a homeostasia seja retomada (MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014).

Nesse sentido, a pele é uma via atrativa e acessível de administração de substâncias devido aos problemas associados às outras rotas de administração, como a oral e parenteral (ASBILL; MICHNIAK, 2000). Ainda apresenta vantagens tais como biodisponibilidade melhorada de substâncias que são sensíveis a variações de pH e processamento hepático, potencial de fornecimento de substâncias durante um período prolongado, efeitos secundários reduzidos e melhor adesão pelo paciente (MONTENEGRO et al., 2016).

ÓLEO ESSENCIAL DE CASCA-PRECIOSA

A família Lauraceae contém cerca de 52 gêneros e aproximadamente 2500 - 3500 espécies distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais, com algumas ocorrências em clima temperado, com grande representatividade na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, sendo composta predominantemente por árvores e arbustos (ROHWER, 1993; MORAES, 2007). No Brasil já foram identificados 24 gêneros e 441 espécies (QUINET et al., 2015). A maioria dos membros desta família fornece madeira valiosa, óleos aromáticos e substâncias importantes que podem ser utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia (BARBOSA; BAITELLO; MORAES, 2012).

Aniba canelilla (Kunth) Mez (sinônimos: *Aniba elliptica* A. C. Sm., *Cryptocarpa canelilla* Kunth) pertence à família Lauraceae e é uma planta aromática abundante na região Amazônica, onde é popularmente denominada como “casca-preciosa” (Figura 1) (SIQUEIRA et al., 2010). Pode ser conhecida ainda pelos seus outros

nomes populares, sendo estes preciosa, folha-preciosa, pau-precioso, canelão, casca-do-maranhão, falsa-canela, louro-inamuí, amapaiama epereiorá (MORS et al., 2000; MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001). É uma das 29 espécies do gênero *Aniba* no Brasil (QUINET et al., 2015). Distribui-se amplamente nas matas pluviais da América do Sul, desde o interior da Guiana Francesa, ao longo do escudo das Guianas, Suriname, Venezuela e Colômbia, até a Amazônia peruana. No Brasil, ocorre predominantemente nos Estados do Pará e Amazonas (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001).

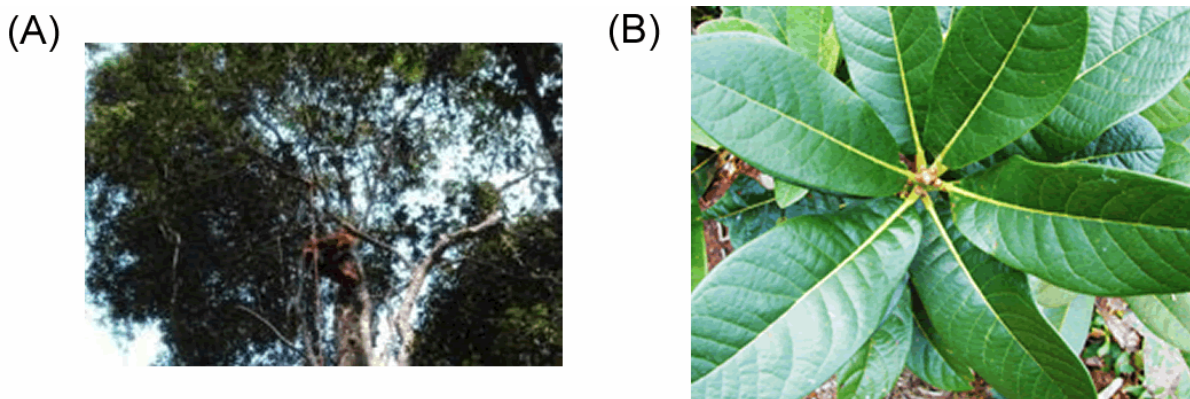


Figura 1. Árvore (A) e folhas (B) da *Aniba canelilla* (Fonte: Adriana Manhães e Surya Brasil).

A *Aniba canelilla* é considerada uma espécie importante e histórica na Amazônia. Possui um aroma semelhante ao da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) e devido a isso, muitas expedições portuguesas e espanholas, após o descobrimento do Brasil, penetravam na região Amazônica em busca desta especiaria (NARANJO et al., 1981; SIQUEIRA et al., 2010).

A madeira do tronco, galhos finos e folhas de casca-preciosa são usados como tempero e ingrediente na culinária local. Estes também são empregados na elaboração de fragrâncias e aromatizantes (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001). De diversas partes da planta é possível obter o óleo essencial. A partir da casca de *A. canelilla* pode-se ter um rendimento de óleo essencial em torno de 0,7 - 1% do peso seco da planta por hidrodestilação (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960; SIQUEIRA et al., 2010).

Índios Chimane na Bolívia utilizavam infusões da casca-preciosa para o tratamento de diarreia, dor de cabeça e febre (OGER et al., 1994). Outros relatos etnofarmacológicos ainda reforçam a utilização da *Aniba canelilla* para problemas digestivos e tosse, além de ser empregada como antiespasmódica, estimulante do sistema nervoso central e carminativa (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001). Ademais, possíveis aplicações tópicas são sugeridas pelo seu uso etnobotânico. O óleo essencial de *Aniba canelilla* é usado na medicina popular contra acnes, dermatites, infecções diversas e ferimentos (MORS et al., 2000).

A composição do óleo essencial obtido das folhas e galhos finos da *A. canelilla* após hidrodestilação foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas. Foram identificados 42 compostos, dos quais o 1-nitro-2-feniletano foi o que apresentou maior porcentagem, nas folhas, em torno de 71,2% e nos galhos finos em torno de 68,2% (LIMA et al., 2004). No óleo essencial de *Aniba canelilla*, o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol são os componentes que se encontram em maior abundância (Figura 2) (OGER et al., 1994; MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001; TAVEIRA et al., 2003). Outros compostos ainda podem estar presentes no óleo essencial proveniente das folhas, galhos e casca, dentre eles o α -pineno, β -pineno, α -terpineol, safrol, eugenol, p-cimeno, linalol, α -copaeno, β -cariofileno, espatulenol, β -felandreno e β -sesquifelandreno (OGER et al., 1994; LAHLOU et al., 2005; BARBOSA et al., 2016).

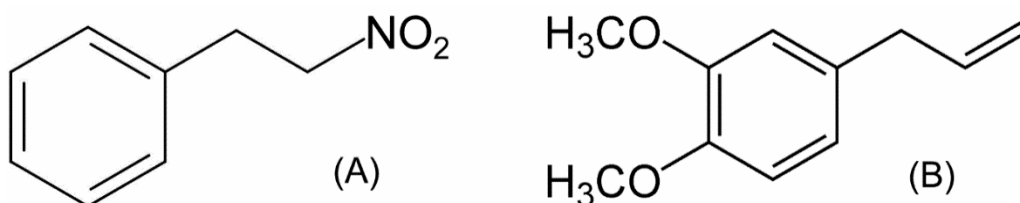


Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano (A) e metileugenol (B) presentes do óleo essencial de casca-preciosa (*Aniba canelilla*).

Derivados nitro em elevada quantidade, tal como o 1-nitro-2-feniletano, são compostos raros encontrados em plantas. A biogênese desse composto envolve a oxidação da fenilalanina seguida de descarboxilação espontânea (Figura 3) (GOTTLIEB; MAGALHÃES; MORS, 1961). O 1-nitro-2-feniletano também é o constituinte do óleo essencial de casca-preciosa responsável pelo aroma característico de canela (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960; SIQUEIRA et al., 2010). Além da *Aniba canelilla*, este composto também é encontrado nos frutos de *Dennettia tripetala*, nas flores de *Stephanotis floribunda*, na madeira, casca e folhas de *Ocotea pretiosa* e nas folhas de *Uvaria chamae* (GOTTLIEB, OTTO RICHARD; MAGALHÃES, 1959; NARANJO et al., 1981; POTT; PICHERSKY; PIECHULLA, 2002; OWOLABI et al., 2013; OYEMITAN et al., 2013). É considerado constituinte do sabor do tomate juntamente com o 2-fenilacetaldeído e 2-feniletanol (TIEMAN et al., 2006).

Já o metileugenol é um componente volátil metilado derivado do eugenol, produto da fenilalanina pela via do ácido chiquímico (Figura 3), e é um dos compostos presentes em fragrâncias e essências (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001; TAN; NISHIDA, 2012). O metileugenol também é encontrado no óleo essencial de *Ocimum campechianum* Mill (alfavaca) e de *Laurus nobilis* L. (louro) (MARZOUKI et al., 2009; PINO BENITEZ; MELÉNDEZ LEÓN; STASHENKO, 2009).

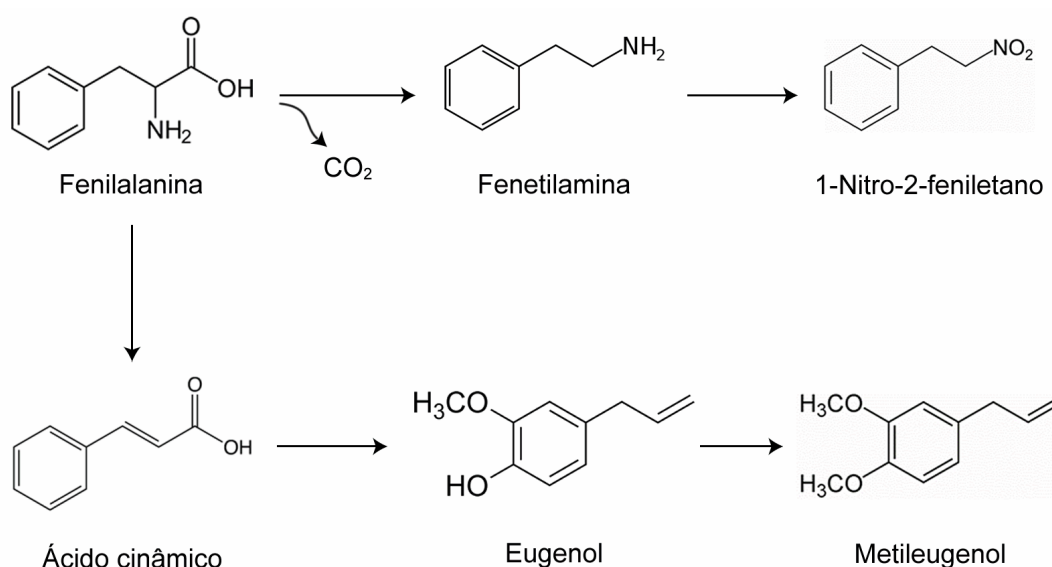


Figura 3. Biogênese do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir da fenilalanina através da via do ácido chiquímico.

Sugere-se que as percentagens no 1-nitro-2-feniletano e metileugenol sejam dependentes do solo e da estação de coleta na Amazônia. Os percentuais seriam maiores no período chuvoso, sendo que o 1-nitro-2-feniletano poderia atingir valores próximos a 95% e o metileugenol atingiria um máximo em torno de 18%. Na temporada de seca estes valores se alternariam, ocorrendo um decréscimo do 1-nitro-2-feniletano (39%) e um aumento considerável do metileugenol (45%) (TAVEIRA et al., 2003). Ademais, propõe-se ainda que a biossíntese desses compostos seja interdependente, já que quando um composto se encontra em maior quantidade, o outro reduz proporcionalmente (OGER et al., 1994). Essa variação de teor de ambos os compostos majoritários poderia estar relacionada à função fisiológica da planta (TAVEIRA et al., 2003), no que tange proteção contra fatores ambientais, ou ainda proteção mecânica, química e biológica contra predadores.

Em adição às propriedades etnofarmacológicas já relatadas, estudos determinaram o potencial antioxidante e citotóxico do óleo essencial de casca-preçiosa e do 1-nitro-2-feniletano (SILVA et al., 2007). Atividade antioxidante também foi relatada para extratos da casca de *A. canelilla* (MARTINS et al., 2016). Estudos apontaram, ainda, efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelilla* administrado por via intravenosa em ratos normotensivos e hipertensos, causando hipotensão e bradicardia (LAHLOU et al., 2005; INTERAMINENSE et al., 2011). Ademais, sugere-se que o composto isolado 1-nitro-2-feniletano e o óleo essencial de *Aniba canelilla* apresentam atividade contrátil antiespasmódica mediada por canais de cálcio, bem como ambos apresentam propriedades vasorelaxantes (INTERAMINENSE et al., 2013).

O 1-nitro-2-feniletano ainda apresentou resultados significativos com relação à atividade fungistática, hipnótica, ansiolítica e anticonvulsivante (OGER et al., 1994; OYEMITAN et al., 2013). Quanto ao metileugenol, este demonstrou propriedades antissépticas, fungicidas e anestésicas (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001).

Atividade tripanocida *in vitro* contra *Trypanosoma evansi* também foi relatada para o óleo essencial de casca-preciosa, 1-nitro-2-feniletano, metileugenol e mistura desses dois compostos, sugerindo que estes podem ser uma alternativa viável para o tratamento de infecções por *T. evansi* (GIONGO et al., 2017).

Lima e colaboradores (2009) evidenciaram que o 1-nitro-2-feniletano isolado a partir da *Aniba canelilla* apresenta efeito antinociceptivo constatado pelos testes de contorção induzida por ácido acético em camundongos por via intraperitoneal, teste de placa quente (*hot plate*) e teste de formalina. Observou-se também que o composto possui atividade analgésica aparentemente de origem periférica, sugerindo atividade sobre a segunda fase inflamatória. Desse modo, os autores sugeriram que receptores opioides sejam os responsáveis pela analgesia do 1-nitro-2-feniletano. Outro estudo recente ainda demonstrou que o composto em questão apresentou atividade anti-inflamatória de origem periférica nos modelos de inflamação por carragenina, dextrana e óleo de cróton atuando na síntese ou liberação de mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (VALE et al., 2013).

Estudos demonstraram que o metileugenol, juntamente com o composto 1,8-cineol do óleo essencial de *Croton adamantinus*, apresentaram atividade antinociceptiva por teste de formalina e por contorção abdominal induzida por ácido acético, após administração intraperitoneal do óleo essencial em camundongos. Esse mesmo estudo ainda sugere que o tratamento tópico com o óleo em questão apresentou atividade significativa frente à cicatrização de feridas, demonstrando, portanto, uma possível atividade cicatrizante dos componentes (XIMENES et al., 2013). Outro estudo ainda sugere que o metileugenol, administrado por via oral, exibe efeito antinociceptivo sobre a segunda fase da dor induzido por formalina em patas de camundongos. Desse modo, o estudo propõe que o mecanismo de antinocicepção estaria correlacionado com a ativação de receptores GABA A em sítios pós-sinápticos, inibindo assim a ativação de receptores de NMDA. Esse mesmo estudo verificou que o metileugenol não afeta COX-1 e COX-2 (YANO et al., 2006). Ademais, outro estudo ainda reporta que injeção intraperitoneal de metileugenol entre 200 e 300 mg/kg promoveu insensibilidade ao pinçar a cauda de camundongos e ratos (CARLINI; DALLMEIER; ZELGER, 1981).

Como observado, diversos estudos atribuem ação antinociceptiva e anti-inflamatória aos compostos 1-nitro-2-feniletano e metileugenol. Isso suscita interesse no emprego do óleo essencial de *Aniba canelilla* para tratamento da dor e inflamação, já que ambos compostos representam juntos em torno de 90-99% do óleo volátil. Ressalta-se ainda que, até o presente momento, não se conhece na literatura estudo que tenha feito uso deste óleo por via tópica para atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, tornando a aplicação por esta via um atrativo, já que é uma via alternativa de ação terapêutica e também tem a possibilidade de alcançar um local específico acometido (BOLZINGER et al., 2012).

MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPME

Desenvolvida por Arthur e Pawliszyn com o objetivo de facilitar a preparação de amostras, a técnica de microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction* – SPME) teve como premissa inicial imergir fibras poliméricas em soluções aquosas contendo analitos, e posteriormente dessorver estas em injetor de cromatógrafo gasoso (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) consiste em deixar uma pequena quantidade de fase extrativa (revestimento) exposta junto à amostra por um determinado período de tempo. Para a extração, utiliza-se uma fibra de 1 cm de comprimento composta por sílica fundida revestida com uma fase polimérica. A fibra é montada em um dispositivo semelhante a uma seringa cuja finalidade é proteção e facilidade de manuseio (Figura 4). Os analitos são absorvidos ou adsorvidos pela fase da fibra (dependendo da natureza do revestimento) e o processo de microextração é considerado completo quando a concentração do analito atinge o equilíbrio entre a amostra e o revestimento de fibra. A quantidade de analito extraído é determinada pela magnitude do coeficiente de partição do analito entre a matriz da amostra e o material de revestimento (MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001; PAWLISZYN, 2012).

Essa técnica não requer a utilização de solventes ou aparelhagem complexa, não necessita concentração prévia dos analitos e pode ser usada em matrizes

líquidas (aquosas) ou gasosas, permitindo inclusive o emprego direto em amostras. Ainda requer pequenos volumes, possibilitando rápida extração de analitos e favorecendo a transferência destes para o instrumento de análise e quantificação. A versatilidade da SPME por conta dos diferentes revestimentos a torna muito interessante, sendo capaz de extrair analitos voláteis, semivoláteis ou não voláteis de diferentes matrizes, dependendo da afinidade. Todos esses fatores denotam vantagens expressivas à técnica de SPME, já que a mesma é conveniente à operação e é relativamente simples (PAWLISZYN, 1999, 2012; MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001).

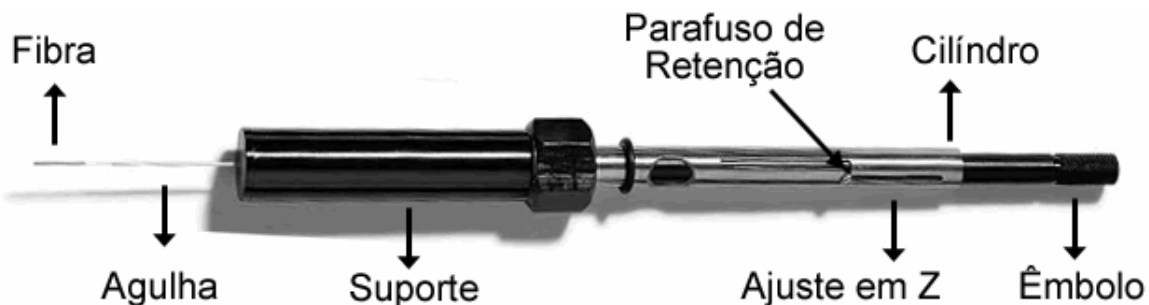


Figura 4. Dispositivo manual de microextração em fase sólida (SPME) (Foto e edição: Tainá Kreutz).

Diversas são as aplicações da SPME, sendo amplamente utilizada para análise de amostras farmacêuticas, alimentícias, toxicológicas, petroquímicas, ambientais e de pesticidas (ĐUROVIĆ; ĐORĐEVIĆ, 2012; MASTROGIANNI et al., 2012; TANKIEWICZ; MORRISON; BIZIUK, 2013; ABDULRA'UF; TAN, 2015; CUEVAS; MORENOROJAS; RUIZ-MORENO, 2016; GENTILI et al., 2016).

Três modos básicos de extração podem ser realizados usando SPME (Figura 5): extração direta, extração no modo *headspace* e extração envolvendo proteção por membrana.

No modo de extração direta (Figura 5A), a fibra revestida é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente da amostra para a fase extrativa (revestimento da fibra). Na extração por SPME envolvendo proteção por membrana (Figura 5C), a fibra é separada da amostra por uma membrana seletiva que permite que os analitos de interesse atravessem, bloqueando e impedindo a passagem de interferentes. O objetivo principal desse modo de extração seria,

portanto, utilizar uma barreira para proteger a fibra contra os efeitos causados por compostos de elevado peso molecular quando são analisadas amostras muito contaminadas e complexas. Já no modo *headspace* (Figura 5B), os analitos necessitam ser transportados através de uma camada de ar para que atinjam o revestimento da fibra. Dessa forma, os analitos são extraídos da fase gasosa que se encontra em equilíbrio com a amostra. O modo *headspace* permite a proteção da fibra de efeitos provocados por substâncias não voláteis de elevado peso molecular presentes nas amostras, admite modificações na matriz (tais como ajuste do pH e adição de sais) sem afetar a fibra e ainda permite extrair com maior rapidez compostos voláteis (PAWLISZYN, 1999).

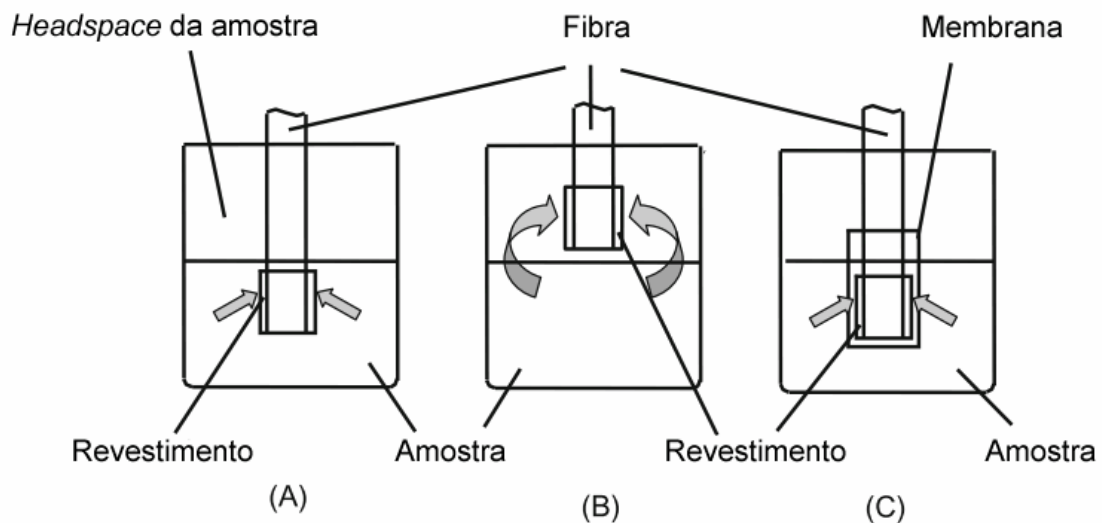


Figura 5. Principais modos realizados por microextração em fase sólida: extração direta (A), extração via *headspace* (B), extração envolvendo proteção por membrana (C) (Adaptado de PAWLISZYN, 2012).

Como a SPME é capaz de extrair uma ampla gama de analitos (voláteis, semivoláteis e não voláteis) com polaridades diversas, é importante atentar-se aos tipos de revestimento (PAWLISZYN, 2012). Fibras com revestimentos variados estão disponíveis comercialmente (Tabela 1). A escolha correta é essencial ao processo extrativo, podendo afetar a seletividade da extração, e é influenciada preliminarmente pela polaridade e volatilidade dos analitos pretendidos (PAWLISZYN, 1999; MILLS; WALKER, 2000). As características da fase extratora, se polimérica líquida ou polimérica sólida, devem ser consideradas. Revestimentos

sólidos possuem estrutura cristalina, reduzindo substancialmente os coeficientes de difusão dentro da estrutura, e ainda apresentam uma área de superfície limitada para adsorção. Nesse tipo de fase, a sorção ocorre apenas na superfície porosa do revestimento, podendo os analitos com afinidade maior pela fase extratora deslocar aqueles com menor afinidade (competição). Já revestimentos líquidos permitem que os analitos penetrem todo o volume do revestimento e fiquem ali absorvidos dentro de um tempo de extração razoável (PAWLISZYN, 2012). Alguns revestimentos possuem espessuras diferentes. Revestimentos finos fornecem uma rápida difusão e por consequência diminuem o tempo de extração de compostos semivoláteis, enquanto revestimentos mais espessos permitem o aumento da sensibilidade extrativa e da retenção de compostos mais voláteis, mas, em contrapartida, requerem um tempo de equilíbrio maior (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007). O polidimetilsiloxano (PDMS) é o revestimento apolar mais comum, e normalmente é o primeiro a ser considerado para processos extrativos, por ser robusto e capaz de suportar temperaturas bastante elevadas (PAWLISZYN, 1999, 2012; MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001).

Além do revestimento da fibra, diversos outros fatores influenciam a eficiência do processo de extração por SPME. Dentre eles estão temperatura e tempo de extração, efeito de força iônica, volume do *headspace*, agitação, pH e concentração de solvente orgânico na amostra (CÂMARA; ARMINDA ALVES; MARQUES, 2006; PAWLISZYN, 2012).

A temperatura pode influenciar positiva ou negativamente a extração, dependendo do objetivo da análise. Aumentar a temperatura de extração pode reduzir significativamente o tempo de equilíbrio e tornar o procedimento mais rápido. Isso ocorre devido ao aumento dos coeficientes de difusão dos analitos em temperaturas mais elevadas durante a SPME, ampliando assim as taxas de transferência de massa para a fibra. Contudo, como o processo de extração é exotérmico, a quantidade de analitos extraídos poderá diminuir na temperatura de equilíbrio, diminuindo também o tempo requerido para atingir o equilíbrio. Isso se deve à diminuição da constante de distribuição dos analitos. Desse modo, se o objetivo principal for atingir uma quantidade elevada de analitos, deve-se almejar no

processo de extração a maior temperatura que promova a extração com a sensibilidade mais satisfatória (PAWLISZYN, 1999, 2012).

Tabela 1. Principais fibras de microextração em fase sólida (SPME) disponíveis no mercado (Adaptado de MILLS; WALKER, 2000).

Revestimento da Fibra	Espessura do filme (μm)	Polaridade	Processo	Temperatura Máxima ($^{\circ}\text{C}$)	Usos recomendados
	100	Apolar	Absorção	280	Voláteis
Polidimetilsiloxano (PDMS)	30	Apolar	Absorção	280	Semivoláteis apolares
	7	Apolar	Absorção	340	Semivoláteis medianos a apolares
	65	Bipolar	Adsorção	270	Voláteis polares
Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	60	Bipolar	Adsorção	270	Uso geral
	65	Bipolar	Adsorção	270	Voláteis polares
Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) (Fibra StableFlex)	65	Bipolar	Adsorção	270	Voláteis polares
Poliacrilato (PA)	85	Polar	Absorção	320	Semivoláteis polares
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)	75	Bipolar	Adsorção	320	Gases e voláteis
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) (Fibra StableFlex)	85	Bipolar	Adsorção	320	Gases e voláteis
Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB)	65	Polar	Adsorção	265	Analitos polares
Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB) (Fibra StableFlex)	70	Polar	Adsorção	265	Analitos polares
Carowax/Templated Resin (CW/TPR)	50	Polar	Adsorção	240	Surfactantes
Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Fibra StableFlex)	50/30	Bipolar	Adsorção	270	Odor e aroma
	50/30	Bipolar	Adsorção	270	Odor e aroma

O tempo adequado para análise é aquele em que o analito atinge o equilíbrio entre a amostra e o revestimento da fibra. Nesse ponto, a quantidade de analito extraído permanecerá constante e corresponderá, nos limites de erro experimental,

à quantidade extraída após o tempo infinito (MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001).

A adição de sal (*salting out*) pode aumentar ou diminuir a quantidade extraída de analitos. Em geral, a adição de sal aumenta o efeito de força iônica, e este, por sua vez, aumenta com o aumento da polaridade do composto. Ademais, o aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando sua extração pela fibra. Conseqüentemente, a adição de sal pode aumentar a sensibilidade da extração, diminuir os limites de detecção de analitos e normalizar a concentração de eletrólitos em matrizes diversas. O NaCl é o sal mais utilizado para aumentar o efeito de força iônica e concentrações deste entre 1% e 30% tem sido empregadas para análise de amostras aquosas (LANÇAS, 2004; PAWLISZYN, 2012).

O volume de amostra, o volume do *headspace* e o tamanho do frasco de análise também interferem no processo de extração por SPME. É sabido que frascos maiores são mais fáceis de acomodar amostras sólidas e semissólidas. Portanto, o volume de amostra e o tamanho do frasco de análise devem ser adequados de modo a diminuir o tempo de extração no modo *headspace* (PAWLISZYN, 1999; WERCINSKI, 1999).

A agitação promove maior rapidez no processo extrativo por fazer com que os analitos na amostra atinjam o equilíbrio em menos tempo. Vários são os métodos de agitação que podem ser usados na SPME, estando entre eles a agitação magnética, a vibração da agulha e a sonicação (MILLS; WALKER, 2000; PAWLISZYN, 2012).

Vale lembrar que na SPME, apenas analitos neutros e não dissociados são extraídos. Desse modo, a conversão para formas neutras por ajuste de pH pode melhorar a sensibilidade do método. Assim, pelo ajuste de pH, ácidos e bases podem ser convertidas para suas formas neutras e favorecer o processo extrativo (MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001; PAWLISZYN, 2012).

Também é relevante a observância da concentração de solvente orgânico nas amostras. Se durante o processo de validação de método forem adicionados

solventes orgânicos polares voláteis com a finalidade de dissolver analitos de interesse, então a concentração destes primeiros deve ser suficientemente baixa para não influenciar o processo de SPME. Geralmente, pequenas quantidades de solventes orgânicos não afetam a extração, mas é importante manter a quantidade de solvente orgânico abaixo de 5% do volume da amostra, evitando assim problemas significativos de recuperação e precisão (PAWLISZYN, 1999, 2012).

Como os compostos majoritários da *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, são voláteis, considera-se que a cromatografia gasosa seria a metodologia mais apropriada para identificar e quantificar esses compostos. Ademais, fazendo uso da técnica de SPME, o processo de extração seria facilitado, já que possui alta sensibilidade, preserva as características dos analitos e ainda reduz o uso de solventes, necessitando apenas de otimização dos fatores que influenciam a eficiência do processo de extração.

DESENHO EXPERIMENTAL

A fim de maximizar a eficiência das descobertas científicas, minimizar gastos e custos na pesquisa, e ainda satisfazer a ampliação dos requisitos de qualidade das agências regulatórias, pesquisadores desenvolveram formas para obter maiores informações de um experimento com menos trabalho e dispêndio de tempo (HIBBERT, 2012; MONTGOMERY, 2013; CANDIOTI et al., 2014).

Nesse sentido, nas últimas décadas, a utilização de desenho experimental (DoE) teve um crescimento importante, e tornou-se uma ferramenta de extrema relevância para melhorar o processo de produção de produtos (HIBBERT, 2012; MONTGOMERY, 2013). Desenho experimental nada mais é do que um resultado específico multivariado de avaliações empíricas, definido por uma matriz composta pelas diferentes combinações de níveis das variáveis estudadas, podendo ter caráter linear, quadrático ou de interação, que pode ser usada para promover informações sobre um determinado sistema (BEZERRA et al., 2008; HIBBERT, 2012). Em outras palavras, é uma ferramenta utilizada para minimizar o número de

experimentos e otimizar processos, tendo como base a análise estatística (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Em um desenho experimental, a fim de se escolher o melhor planejamento a ser utilizado, é imprescindível conhecer principalmente os fatores e respostas de interesse, e também determinar o objetivo pretendido com os experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Alguns passos devem ser considerados para a elaboração de um desenho experimental, sendo eles: 1) definição do objetivo do experimento, 2) detecção de todos os fatores que possam afetar o desenho, 3) planejamento dos experimentos, 4) execução dos experimentos, e 5) análise dos dados obtidos (LEARDI, 2009). Tão logo se tenha as informações necessárias para o planejamento, é possível escolher o tipo de desenho experimental que será aplicado. Dentre os existentes, destaca-se o de superfície de resposta.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi desenvolvida por Box e colaboradores na década de 50 e consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que se utilizam no ajuste de modelos empíricos aos dados experimentais obtidos em relação ao desenho experimental. Desse modo, esse tipo de metodologia permite analisar a influência dos parâmetros sobre uma ou mais variáveis, descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas e ainda otimizar respostas (BEZERRA et al., 2008; MONTGOMERY, 2013). A metodologia de superfície de resposta apresenta duas etapas distintas em seu processamento, sendo elas: modelagem e deslocamento. A modelagem consiste no ajuste do modelo matemático (linear, quadrático) às respostas obtidas. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Sendo assim, através dessa metodologia, é possível analisar a aproximação entre a superfície ajustada e a função de resposta verdadeira, permitindo a estimação eficaz dos parâmetros do modelo (MONTGOMERY, 2013).

Dentre os desenhos experimentais que se baseiam na metodologia de superfície de resposta temos aquele proposto por Box e Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960). Este pertence à classe de desenhos de segunda ordem baseando-se em delineamentos fatoriais incompletos de três níveis, resultando em planejamentos muito eficientes em termos do número de execuções (FERREIRA et al., 2007; MONTGOMERY, 2013). Uma grande vantagem desse desenho é que ele não possui combinações para cada um dos fatores simultaneamente nos seus níveis altos ou baixos. Assim sendo, este desenho é útil para aqueles que desejam evitar pontos extremos de condição, evitando que resultados indesejados surjam. Ademais, leva-se ainda em conta que o desenho é capaz de construir sequências experimentais, estimar modelos quadráticos, detectar falta de ajuste de modelo e ainda permite utilização de blocos (FERREIRA et al., 2007).

Partindo-se do desenho experimental de superfície de resposta do tipo Box-Behnken, é simples encontrar as condições ideais de trabalho para uma única resposta ou ainda para diferentes variáveis. A função Derringer ou função de desejabilidade (do inglês *desirability function*), é uma metodologia bastante utilizada para otimização de processos, baseando-se na construção de uma função desejável para cada resposta. Assim, as medidas de cada resposta são transformadas em uma escala de desejabilidade. Os parâmetros desejados são delimitados e a escala da função de desejabilidade varia entre $d = 0$, para uma resposta totalmente indesejável, e $d = 1$, para uma resposta totalmente desejada. Com as desejabilidades individuais, é então possível obter a desejabilidade de todas as respostas juntas (D). Essa metodologia traz principalmente economia e objetividade na otimização de múltiplos parâmetros e respostas (DERRINGER; SUICH, 1980; BEZERRA et al., 2008; CANDIOTI et al., 2014).

VALIDAÇÃO BIOANALÍTICA E TRATAMENTO DE DADOS

A validação de uma metodologia é um processo necessário, capaz de demonstrar que um método analítico ou bioanalítico é viável para o uso pretendido e pode oferecer resultados precisos, exatos e reprodutíveis. Pretende ainda

demonstrar o quanto um método é capaz de quantificar um analito em uma determinada matriz (GONZÁLEZ et al., 2014).

Segundo o *Food and Drug Administration*, são necessários alguns parâmetros para que um método bioanalítico seja considerado válido. Dentre estes parâmetros temos: seletividade, precisão, exatidão e recuperação, curva de calibração, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), reprodutibilidade e estabilidade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

O primeiro critério para um analista avaliar se a metodologia aplicada está adequada é através da seletividade, onde se observa a habilidade de discriminar um analito frente a outros elementos interferentes (ROZET et al., 2007).

Outro passo fundamental ao processo de validação é a seleção de uma função de calibração apropriada. A faixa de calibração de um procedimento analítico deve obedecer a uma faixa específica, demonstrando uma relação entre a resposta e a concentração de um analito em uma amostra. Sendo demonstrada uma relação entre resposta e concentração, diferentes tipos de funções e métodos de estimação destes parâmetros podem ser ponderados (SADRAY; REZAEI; REZAKHAH, 2003). O modelo mais simples que adequadamente descreva a relação entre concentração e resposta deve ser aplicado (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013). Nesse caso, o modelo linear é o comumente preferível devido à complexidade na utilização de modelos não lineares. Contudo, diversos modelos podem ser utilizados, tais como regressão linear ponderada e transformação de resultados, desde que seja mantido o pressuposto inicial de que o procedimento analítico deve fornecer resultados adequados e exatos para medições futuras (SINGTOROJ et al., 2006; ROZET et al., 2007).

Após a delimitação do modelo mais adequado aos dados, os demais parâmetros podem ser estimados, tais como precisão, exatidão e sensibilidade do método (HUBERT et al., 2007).

Desse modo, a validação de um método é um processo fundamental, que confirma os resultados obtidos para um determinado analito em uma matriz biológica e fornece maior confiabilidade aos resultados (GONZÁLEZ et al., 2014).

CAPÍTULO II

Determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil in skin permeation samples by optimized headspace solid-phase microextraction gas chromatography with flame ionization detector

Capítulo apresentado na forma de artigo submetido ao periódico *Analytica Chimica Acta* (fator de impacto 4.712).

O capítulo 2, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 54 - 98, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido em periódico científico. Consiste na validação de metodologia bioanalítica otimizada por microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID) para a determinação do 1-nitro-2-feniletano (NP) e metileugenol (ME) a partir do óleo essencial de Aniba canelilla (H. B. K.) Mez em diferentes amostras provenientes de estudo de permeação cutânea in vitro. A metodologia bioanalítica foi validada com seletividade, linearidade, precisão e recuperação adequadas sendo capaz de quantificar os principais compostos do óleo essencial de A. canelilla em amostras de permeação cutânea, constatando elevada permeação e retenção no fluido receptor e derme.

DISCUSSÃO GERAL

A casca-preciosa é uma árvore amazônica da família Lauraceae, conhecida cientificamente por *Aniba canelilla* (Kunth) Mez. Apresenta como componentes majoritários do óleo essencial o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001; QUINET et al., 2015).

Na literatura, atividade antinociceptiva, analgésica e anti-inflamatória foram atribuídas ao 1-nitro-2-feniletano, sugerindo interferência no processo de geração de prostaglandinas e produção de mediadores químicos da inflamação, e analgesia periférica (LIMA et al., 2009; VALE et al., 2013). Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva também foram observadas para o metileugenol (YANO et al., 2006; CHOI et al., 2010; XIMENES et al., 2013). Muito embora essas atividades para ambos os compostos tenham sido investigadas, estes estudos somente consideraram a administração pelas vias intraperitoneal ou oral, não relatando qualquer atividade pela via tópica. Até o momento, não existem estudos que correlacionem os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do óleo essencial de casca-preciosa ou de seus compostos majoritários pela via tópica.

Tendo como base estas características, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método bioanalítico otimizado por microextração em fase sólida no modo *headspace* em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (HS-SPME-GC-FID) com vistas a determinação e quantificação do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol em amostras provenientes de estudos de permeação e retenção cutânea em células do tipo Franz. As amostras utilizadas no processo de validação foram pele de orelha suína e fluido receptor.

Ressalta-se que o processo de microextração em fase sólida consiste na utilização de uma fase extratora capaz de reter os analitos presentes em uma determinada matriz (PAWLISZYN, 2012). Durante o processo de adsorção ou absorção pela fase extratora, diversos fatores podem interferir na extração, desde a espessura e o tipo de revestimento da fibra adotados, tempo e temperatura de extração, efeito de força iônica, volume do *headspace*, agitação, pH e concentração de solvente orgânico na amostra (CÂMARA; ARMINDA ALVES; MARQUES, 2006; PAWLISZYN, 2012).

A fim de investigar alguns desses fatores que podem interferir no processo de extração do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de casca preciosa, foi feito um desenho experimental do tipo Box Behnken 3³, objetivando investigar e delimitar as melhores condições de extração para ambos os compostos. Para o processo de extração se utilizou fibras com revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espessura, já que esse é um tipo de revestimento comum na literatura e capaz de absorver uma ampla gama de componentes (MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001; PAWLISZYN, 2012). Ademais, ainda se adotou frascos de análise de 20 mL, objetivando manter uma proporção adequada entre volume de amostra e volume de *headspace* durante o processo para minimizar o tempo de extração (PAWLISZYN, 1999). Quanto à amostra, empregou-se 1 mL em todas as análises.

O planejamento fatorial Box Behnken 3³ investigou a influência das seguintes variáveis sob a extração de ambos os compostos: temperatura do banho de aquecimento (50 a 70 °C), tempo de exposição da fibra (10 a 30 minutos) e efeito de força iônica (adição de NaCl de 0 a 5% m/v). As respostas consideradas foram as áreas do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol obtidos no equipamento analítico.

Foi possível adequar equações significativas de predição de área ao 1-nitro-2-feniletano e metileugenol com base na influência das variáveis temperatura, tempo e força iônica. Ainda se observou que a temperatura é um fator primordial no processo de extração de ambos os compostos. A elevação de temperatura foi capaz de favorecer a extração dos compostos em questão, reduzindo assim o tempo de equilíbrio necessário à extração, conforme já demonstrado na literatura (PAWLISZYN, 2012). Entretanto, temperaturas altas despontaram redução na eficiência da extração, possivelmente devido à diminuição na constante de distribuição dos analitos (LORD; PAWLISZYN, 2000; CÂMARA; ARMINDA ALVES; MARQUES, 2006). O tempo de extração mostrou-se um fator significativo à extração do metileugenol, possivelmente devido ao maior peso molecular e, conseqüentemente, maior tempo em atingir o equilíbrio no procedimento de extração. O mesmo já não foi observado para o 1-nitro-2-feniletano que atingiu o equilíbrio anteriormente ao metileugenol em detrimento de seu reduzido peso molecular e alta volatilidade (MILLS; WALKER, 2000; PAWLISZYN, 2012). O efeito

de força iônica foi relevante a ambos os compostos, já que a adição de sal é capaz de reduzir a solubilidade de analitos favorecendo o processo de difusão no ambiente de *headspace* até a fibra (NAMIEŚNIK; ZYGMUNT; JASTRZĘBSKA, 2000; PAWLISZYN, 2012).

Considerando os efeitos acima relatados, após otimização por função de desejabilidade (*desirability function*, D) (DERRINGER; SUICH, 1980), obteve-se que as condições ótimas de extração que gerariam maiores respostas em área para ambos os compostos no equipamento analítico seriam 53 °C, 21 minutos e adição de 5% m/v de NaCl. Predições teóricas com base na equação gerada pelo modelo experimental foram feitas e estas se mostraram bastante semelhantes às predições experimentais, sugerindo que as condições de extração otimizadas seriam adequadas, consistentes e aplicáveis.

Após o procedimento de otimização das condições de extração, procedeu-se à validação de uma metodologia bioanalítica para quantificar o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor. Para tanto, curvas de calibração em uma ampla faixa foram elaboradas e analisadas para ambos os compostos nas diferentes matrizes, evidenciando, após regressão linear simples por mínimos quadrados, que os resultados obtidos para as curvas de calibração apresentavam resíduos heterocedásticos e recuperação inadequada, mesmo com coeficientes de correlação elevados ($r^2 > 0,98$). Esse resultado inesperado com possível desvio de linearidade e falta de ajuste do modelo provocou o interesse em encontrar o modelo matemático de melhor ajuste aos dados obtidos, uma vez que o emprego de análises estatísticas inadequadas às curvas de calibração podem gerar erros em medidas futuras e imprecisão nos resultados (ROZET et al., 2007). Outrossim, esse desvio de linearidade decorre de um ou mais fatores, tais como diferentes tempos de extração dos analitos, características intrínsecas de processos bioanalíticos como presença de matriz e ampla faixa de concentração e presença de solvente orgânico, mesmo que em concentração dentro da indicada (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002; CÂMARA; ARMINDA ALVES; MARQUES, 2006; SOUZA et al., 2011; SUN et al., 2011). É importante ressaltar que mesmo se restringindo a curva, ou seja, retirando pontos extremos superiores ou inferiores da curva de calibração, foi constatada a manutenção desse

comportamento não-linear, o que evidencia que alternativas como extrair os compostos da pele e realizar diluições com vistas a proceder a análise dentro de uma faixa estreita não solucionariam a heterocedasticidade dos dados.

O FDA salienta que à curva de calibração deve-se aplicar o modelo mais simples e que melhor descreva a relação entre concentração e resposta (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013). Nesse sentido, várias transformações foram aplicadas às curvas de calibração de ambos os compostos, tais como regressão linear ponderada ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$ e $1/y^2$), Log-Log, Raiz quadrada, Box-Cox, modelo quadrático, modelo polinomial (2 graus de liberdade) e modelos não-lineares (Weibull, Logístico, MMF e Gompertz), visando encontrar aquele que melhor se adequasse às observações obtidas, estabilizasse a variância e normalizasse os resíduos.

Comparando os resultados de todos modelos de regressão para ambos os compostos nas amostras de pele de orelha suína e fluido receptor notou-se que a transformação logarítmica (Log-Log, sendo Log_{10}) foi a que melhor se adequou à relação entre concentração e resposta do equipamento analítico, sendo, portanto, a escolhida para ajustar as curvas de calibração de ambos os compostos. Esse modelo de transformação proporcionou um r^2 elevado, alta porcentagem de recuperação (% RE) em diferentes concentrações, regressão e intercepto significativos, homogeneidade, normalização e baixa soma do quadrado dos resíduos, confirmando a adequabilidade do modelo aos resultados.

Desse modo, a validação bioanalítica para o 1-nitro-2-feniletano e metileugenol foi realizada através de curvas de calibração transformadas em logaritmos na base 10. A metodologia mostrou-se seletiva, com interferentes ausentes no tempo de retenção de ambos os compostos. O limite de detecção e quantificação dos analitos se mostraram precisos e exatos, de modo que o limite de detecção e quantificação para o 1-nitro-2-feniletano e metileugenol foram 0,84 e 2,08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 0,16 e 0,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Ademais, as precisões intra e interdia foram consideradas em conformidade com as diretrizes do FDA, confirmando que o método é preciso para quantificação desses analitos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013). Já os resultados de exatidão (recuperação) de

ambos os compostos foram adequados tanto em pele de orelha suína quanto em fluido receptor, de modo que o 1-nitro-2-feniletano apresentou desvio padrão relativo da recuperação entre 90,47 - 99,94 e o metileugenol entre 91,57 - 101,15%. Efeito matriz baixo foi encontrado para ambos os compostos em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor (efeito matriz > -3,271%) e baixo efeito de *carry-over* foi verificado, permitindo assim a análise aleatória de amostras com concentrações diversas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2012). A solução mãe do óleo essencial de casca-preciosa apresentou estabilidade em temperatura ambiente e geladeira e amostras de pele de orelha suína e fluido receptor exibiram estabilidade em congelador.

Estudos de permeação e retenção em pele de orelha suína por células de difusão do tipo Franz foram empregados ao óleo essencial para avaliar o perfil de permeação dos compostos majoritários. A retenção de ambos os compostos foi na ordem de fluido receptor >> derme >> epiderme >> estrato córneo. A grande retenção do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol do fluido receptor e derme provavelmente se devem às características físico-químicas que os tornam grandes permeantes. Ambos são lipofílicos, possuem log P de 2,1 e 2,5, respectivamente, e massa molecular de 151 Da e 178 Da, respectivamente (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017a, 2017b). Dessa forma, ambos os compostos possuem *Log P* adequado à permeação, baixo peso molecular e tamanho, e afinidade tanto para ambientes hidrofílicos como lipofílicos, explicando assim o grande perfil de permeação e retenção cutânea (MOSS; GULLICK; WILKINSON, 2015). Dentre as camadas da pele, a grande retenção na derme demonstra vantagens significativas, uma vez que essa é a camada de interesse no tratamento de amenidades tópicas como a inflamação. Vale ressaltar que é na derme que se encontram vários tipos celulares responsáveis pelos processos infecciosos, inflamatórios e de cicatrização (BENSON; WATKINSON, 2012).

Com base nos resultados abordados, é possível verificar que a metodologia otimizada e validada por HS-SPME-GC-FID mostrou-se seletiva, precisa, exata e adequada à quantificação dos compostos majoritários 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de *Aniba canelilla*. A validação de método possibilita, assim, o emprego dessa metodologia às futuras quantificações dos

compostos em questão em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor. Ademais, devido ao elevado perfil de permeação e retenção cutânea de ambos os compostos a partir do óleo essencial de casca-preciosa e por conta das características intrínsecas destes mesmos que os tornam bons permeantes, suscita-se o interesse em verificar a atividade anti-inflamatória através de aplicação tópica desse óleo em estudos futuros.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através do estudo realizado pode-se concluir que:

- Um método seletivo para identificação e quantificação do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de casca-preciosa em matriz de pele de orelha suína e fluido receptor foi desenvolvido em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama utilizando fibras de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME-GC-FID);
- Como resultado da otimização dos parâmetros de extração por HS-SPME de ambos os compostos a partir do óleo essencial de casca-preciosa através de desenho experimental do tipo Box Behnken 3³, obteve-se que as melhores condições foram 53 °C, 21 minutos e adição de 5% m/v de NaCl;
- Às curvas de calibração do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de *A. canelilla* em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor foi aplicada transformação logarítmica (Log₁₀), apresentando homocedasticidade, coeficiente de determinação, recuperação e resíduos adequados;
- A validação bioanalítica do método por HS-SPME-GC-FID para a quantificação do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de *A. canelilla* em amostras de pele de orelha suína e fluido receptor se mostrou precisa, exata e com recuperações adequadas;
- A investigação do perfil de permeação e retenção cutânea *in vitro* do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol a partir do óleo essencial de casca-preciosa em células de difusão do tipo Franz evidenciou retenção dos compostos majoritários na ordem de fluido receptor >> derme >> epiderme >> estrato córneo, demonstrando uma elevada retenção na derme, camada essa de interesse no tratamento de inflamações tópicas;
- Estes resultados abrem perspectivas para trabalhos futuros de avaliação da atividade anti-inflamatória tópica deste óleo essencial *in vivo*.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 177, p. 267–273, 2015.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.

ASBAHANI, A. EI; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. EI; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: Local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, n. 1, p. 36–41, 2000.

BARBOSA, P. C. S.; FERNANDES, K. S.; MANHÃES, A. P.; CARNEIRO, S. B.; SAMPAIO, P. de T. B.; WIEDEMANN, L. S. M.; JUNIOR, V. F. da V. New and sustainable essential oils obtained from the long-term explored cinnamomum-like *Aniba canelilla* (In Press). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, n. 37, 2016.

BARBOSA, T. D. M.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de. A família Lauraceae Juss. no município de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 30, p. 5–178, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2001.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010.

BAUMANN, L. **Cosmetic dermatology: Principles and Practice**. 2. ed. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2009.

BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical

chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Variables Quantitative. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

CÂMARA, J. S.; ARMINDA ALVES, M.; MARQUES, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 191–200, 2006.

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. de; CÂMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

CARLINI, E. A.; DALLMEIER, K.; ZELGER, J. L. Methyleugenol as a surgical anesthetic in rodents. **Experientia**, v. 37, n. 6, p. 588–589, jun. 1981.

CEVC, G.; VIÉRL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277–299, 2010.

CHOI, Y. K.; CHO, G.; HWANG, S.; KIM, B. W.; LIM, J. H.; LEE, J.; KIM, H. C.; KIM, W.-K.; KIM, Y. S. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free radical research**, v. 44, n. 8, p. 925–935, 2010.

CORRÊA, M. A. **Cosmetologia: Ciência e Técnica**. São Paulo: Medfarma, 2012.

CUEVAS, F. J.; MORENOROJAS, J. M.; RUIZ-MORENO, M. J. Assessing a traceability technique in fresh oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with an HS-SPME-GC-MS method. Towards a volatile characterization of organic oranges. **Food Chemistry**, 2016.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

ĐUROVIĆ, R. D.; ĐORĐEVIĆ, T. M. Effects of soil composition on solid phase microextraction determination of triazine and organophosphorus pesticides. **Journal**

of **Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 9, p. 851–857, 2012.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation. **EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use**, v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2012.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, (FDA). Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. **U.S. Department of Health and Human Services**, p. 1–34, 2013.

GENTILI, S.; MORTALI, C.; MASTROBATTISTA, L.; BERRETTA, P.; ZAAMI, S. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 282–287, 2016.

GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; SILVA, A. S. da; OLIVEIRA, C. B.; MATTOS, C. B. de; BALDISSERA, M. D.; SAGRILLO, M. R.; MONTEIRO, S. G.; MATOS, M. S. de; SAMPAIO, P. T.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S.; JUNIOR, V. F. da V. Trypanocidal activity of the compounds present in *Aniba canelilla* oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 13–18, 2017.

GOLDSMITH, L. A. My Organ Is Bigger Than Your Organ. **Archives of Dermatology**, v. 126, n. 3, p. 301, 1 mar. 1990.

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M. E.; IRIARTE, G.; BARTOLOMÉ, L.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10–27, 2014.

GOTTLIEB, OTTO RICHARD; MAGALHÃES, M. T. Occurrence of 1-nitro-2-phenylethane in *Ocotea pretiosa* and *Aniba canelilla*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 2070–2071, 1959.

GOTTLIEB, O. R. .; KUBITZKI, K. Chemosystematics of *Aniba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 1, p. 5–12, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Essential oil of the bark and wood of *Aniba canelilla*. **Perfumery and Essential Oil Record**, v. 50, p. 69–70, 1960.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; MORS, W. B. On the biogenesis of organic nitro derivatives and propenylbenzenes. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 33, p. 301–303, 1961.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, p. 2–13, 2012.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p. 70–81, set. 2007.

INTERAMINENSE, L. D. F. L.; RAMOS-ALVES, F. E. Dos; DE SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. da C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 709–716, 2013.

INTERAMINENSE, L. de F. L.; DE SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; DA SILVA, J. K.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. da C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 661–669, dez. 2011.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; DE SIQUEIRA, R. J. B.; FIGUEIREDO, A. F.; INTERAMINENSE, L. F. L.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. D. C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 412–21, 2005.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 161–172, 2009.

LEONARDI, G. R.; SPERS, V. R. E. **Cosmetologia & Empreendedorismo: Perspectivas para a criação de novos negócios**. São Paulo: Pharmabooks, 2015.

LIMA, M. D. P.; SILVA, T. M. D. .; SILVA, J. D. D.; ZOGHBI, M. D. G. B. .; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 329–330, 2004.

LIMA, A. B. de; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; CARVALHO, J. C. T.; SOUSA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 555–559, 2009.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 17–63, 2000.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. das G. B.; ANDRADE, H. H. de A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém: Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. B. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34–39, 2016.

MARZOUKI, H.; PIRAS, A.; SALAH, K. B. H.; MEDINI, H.; PIVETTA, T.; BOUZID, S.; MARONGIU, B.; FALCONIERI, D. Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs. **Natural Product Research**, v. 23, n. 4, p. 343–354, 2009.

MASTROGIANNI, O.; THEODORIDIS, G.; SPAGOU, K.; VIOLANTE, D.; HENRIQUES, T.; POULIOPOULOS, A.; PSAROULIS, K.; TSOUKALI, H.; RAIKOS, N. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1–3, p. 105–109, 2012.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 81–102, 2014.

MESTER, Z.; STURGEON, R.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 3, p. 233–260, 2001.

MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 267–287, 2000.

MONTENEGRO, L.; LAI, F.; OFFERTA, A.; SARPIETRO, M. G.; MICICCHÈ, L.; MACCIONI, A. M.; VALENTI, D.; FADDA, A. M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100–112, 2016.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013.

MORAES, P. L. R. **Taxonomy of Cryptocarya species of Brazil III**. Brussels: The Belgian Development Cooperation, 2007.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A.; DEFILIPPS, R. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications Incorporation, 2000.

MOSS, G. P.; GULLICK, D. R.; WILKINSON, S. C. **Predictive methods in percutaneous absorption**. Berlin: Springer-Verlag, 2015.

NAMIEŚNIK, J.; ZYGMUNT, B.; JASTRZĘBSKA, A. Application of solid-phase microextraction for determination of organic vapours in gaseous matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1–2, p. 405–418, 2000.

NARANJO, P.; KIJOA, A.; GIESBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R. *Ocotea quixos*, American cinnamon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 233–236, 1981.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID=80208**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/_2-Nitroethyl_benzene#section=Top>. Acesso em: 5 fev. 2017a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID=7127**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methyleugenol#section=Top>>. Acesso em: 5 fev. 2017b.

OGER, J. M.; RICHOMINEO, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez Essential Oil: Analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **Journal Of Essential Oil Research**, v. 497, n. 3, p. 493–497, 1994.

OWOLABI, M. S.; ADEWALE, O. R.; DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. 1-Nitro-2-phenylethane dominates the chemical composition of the leaf essential oil of *Uvaria chamae* from Badagry, Nigeria. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, n. 1, p. 48–50, 2013.

OYEMITAN, I. A.; ELUSIYAN, C. A.; AKANMU, M. A.; OLUGBADE, T. A. Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1315–1322, 2013.

PAWLISZYN, J. **Applications of Solid Phase Microextraction**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. London: Elsevier Inc., 2012.

PINO BENITEZ, N.; MELÉNDEZ LEÓN, E. M.; STASHENKO, E. E. Eugenol and methyl eugenol chemotypes of essential oil of species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill. from Colombia. **Journal of chromatographic science**, v. 47, n. 9, p. 800–803, 2009.

POTT, M. B.; PICHERSKY, E.; PIECHULLA, B. Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 8, p. 925–934, jan. 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de; ASSIS, L.; ALVES, F. M. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. (Ed.). **The families and genera of vascular plants II**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 366–391.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 111–125, 2007.

SADRAY, S.; REZAEI, S.; REZAKHAH, S. Non-linear heteroscedastic regression model for determination of methotrexate in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 787, n. 2, p. 293–302, abr. 2003.

SELZER, D.; ABDEL-MOTTALEB, M. M. a; HAHN, T.; SCHAEFER, U. F.; NEUMANN, D. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 278–294, 2013.

SILVA, J. K. R. da; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. a; MAIA, J. C. S. Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Essential Oil and Methanol Extract of *Aniba canellilla* (H. B. K.) Mez. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. May 2004, p. 9422–9426, 2007.

SINGTOROJ, T.; TARNING, J.; ANNERBERG, A.; ASHTON, M.; BERGQVIST, Y.; WHITE, N. J.; LINDEGARDH, N.; DAY, N. P. J. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 219–227, 2006.

SIQUEIRA, R. J. B. de; MACEDO, F. I. B.; INTERAMINENSE, L. de F. L.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, T. S.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. da C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, n. 1–3, p. 90–98, 2010.

SOUZA, D. Z.; BOEHL, P. O.; COMIRAN, E.; MARIOTTI, K. C.; PECHANSKY, F.; DUARTE, P. C. A. V.; DE BONI, R.; FROEHLICH, P. E.; LIMBERGER, R. P. Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, n. 1–2, p. 67–76, 2011.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 235–242, 2007.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Quantitative analysis of volatiles in transesterified coconut oil by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1882–1888, 2011.

TAN, K. H.; NISHIDA, R. Methyl eugenol: Its occurrence , distribution , and role in nature , especially in relation to insect behavior and pollination. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 56, 2012.

TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-flame-ionization detector (GC-FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 117–123, 2013.

TAVEIRA, F. S. N.; DE LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 69–75, 2003.

TIEMAN, D.; TAYLOR, M.; SCHAUER, N.; FERNIE, A. R.; HANSON, A. D.; KLEE, H. J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8287–8292, 2006.

VALE, J. K. L.; LIMA, A. B.; PINHEIRO, B. G.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; DE SOUSA, G. E. P.; DA SILVA, A. B. F.; SOUSA, P. J. C.; BORGES, R. S. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane. **Planta Medica**, v. 79, n. 8, p. 628–633, 2013.

WERCINSKI, S. A. S. **Solid Phase Microextraction: A Practical Guide**. Boca Raton: CRC Press, 1999.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. **Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system** *Life Sciences*, 1996. .

XIMENES, R. M.; DE MORAIS NOGUEIRA, L.; CASSUNDÉ, N. M. R.; JORGE, R. J. B.; DOS SANTOS, S. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SILVA, M. R.; DE BARROS VIANA, G. S.; ARAÚJO, R. M.; DE SENA, K. X. D. F. R.; DE ALBUQUERQUE, J. F. C.; MARTINS, R. D. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. Essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 758–764, 2013.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; KASE, Y.; TAKEDA, S.; WATANABE, S.; ABURADA, M.; MIYAMOTO, K. ichi. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, n. 1–3, p. 99–103, 2006.

