



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBITECNOLOGIA-PPG/NANO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO O/A A BASE DE ÓLEO

DE COPAÍBA, INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS

MAGNÉTICAS DE ZINCO

ALICE SPERANDIO PORTO

Brasília – DF, Dezembro de 2015.

ALICE SPERANDIO PORTO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO O/A A BASE DE ÓLEO DE
COPAÍBA, INCOPORADAS COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
ZINCO**

ORIENTADOR:

PROF. Drº. JUDES GONÇALVES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília – DF, Dezembro de 2015.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBITECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Alice Sperandio Porto

Título:

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES O/A À BASE DE ÓLEO DE
COPAÍBA, INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
ZINCO**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jules Gonçalves dos Santos
Presidente/Orientador
PPGNANO-UNIR/DFIS

Luciene Batista da Silveira
Prof. Dra. Luciene Batista da Silveira
PPGNANO-UNIR/DFIS

Anselmo Fortunato Ruiz Rodrigues
Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodrigues
PPGNANO-UFAC/CCBN

Brasília - 01 de dezembro de 2015

Agradeço a Deus por permitir que eu concluísse essa etapa da vida. Aos meus amados Pais pelo apoio e incentivo. A minha Filha Sofia, pelo amor incondicional.

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai, Beno Praia Porto e minha Mãe Marli Sperandio que permitiram minha vinda neste mundo, cuidaram de mim e sempre me incentivaram a estudar. A minha Filha Sofia Gouveia Porto, pelo amor incondicional e motivo maior por eu estar me aperfeiçoando intelectualmente. Aos meus irmãos: Anita Sperandio Porto, Cassiano Sperandio Porto, Vladimir Sperandio Porto, Aline Sperandio Porto, Beno Sperandio Porto e Alana Sperandio Porto, por acreditarem que eu conseguiria chegar até aqui. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por permitir minha vinda a este planeta.

Agradeço ao professor Dr. Judes Gonçalves dos Santos, meu orientador, por me orientar, por ter acreditado em mim e pelo respeito e dedicação que sempre teve.

Agradeço aos meus amados Pais, que cuidaram com muito amor da minha Filha quando tive que me ausentar para estudar.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, Professores do IFRO – Campus Ji-Paraná, por sempre colaborarem nas trocas de aulas.

Agradeço a Ingrid, técnica do laboratório da UnB, responsável pelas análises em Microscopia Eletrônica e de Varredura, pela gentileza e dedicação. Ao Prof. Dr. Paulo Souza, pelas análises feitas em EPR. A colega de Mestrado Luiza Iani, pela ajuda com as análises em Potencial Zetasizer.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade (Marie Curie).

RESUMO

O objetivo deste estudo é a síntese de Nanoemulsões com Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas com Óleo de Copaíba bem como sua caracterização. As Nanopartículas produzidas foram o Acetato de Zinco e o Sulfato de Zinco usando o método de coprecipitação. Foram obtidas 12 formulações com concentrações variáveis de Nanopartículas.

Após as Nanoemulsões serem produzidas, foram realizadas medidas para avaliar as características físico-químicas: *pH*, Condutividade, Viscosidade, Densidade, Estresse Térmico, Centrifugação Térmica, Avaliação Macroscópicas, a obtenção de imagens por Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análises em EPR e Potencial ZetaSizer.

Com as medidas realizadas, pode-se constatar a influência da concentração das Nanopartículas nas avaliações de estabilidade das formulações, e o potencial uso em tratamentos de lesões cutâneas.

Palavras-chave: Nanopartícula magnética, Óleo de copaíba, nanoemulsão.

ABSTRACT

The aim of this study is the synthesis of Nanoemulsion preparations with Magnetic Nanoparticles functionalized with Copaiba oil and its characterization. The nanoparticles were produced Zinc Acetate and Zinc Sulphate using the coprecipitation method. 12 formulations were obtained with varying concentrations of nanoparticles.

After nanoemulsions be produced, measurements were performed to evaluate the physical and chemical characteristics : pH , conductivity , viscosity , density , thermal stress , Spin Thermal, macroscopic evaluation , obtaining images for Optical Microscopy , Transmission Electron Microscopy (MET). Scanning Electron Microscopy (MEV), analysis in EPR and potential ZetaSizer.

With the measures taken, it can be seen the influence of the concentration of nanoparticles in the ratings stability of the formulations, and the potential use in skin lesions treatments.

Keywords: magnetic nanoparticle, copaiba oil , nanoemulsion.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	19
Revisão Bibliográfica.....	19
Introdução.....	22
Método de obtenção de Nanopartículas magnéticas e Nanoemulsões.....	26
Óleo de Copaíba.....	28
Acetato de Zinco (CH_3CO_2)₂ $\text{Zn}_2\text{H}_2\text{O}$) e Sulfato de Zinco (ZnSO_4).....	32
Tensoativos Lipofílicos e Hidrofílicos	33
Tensoativo Hidrofílico (não iônico).....	34
Tensoativo Lipofílico.....	34
CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Materias-primas, Reagentes e Solventes.....	36
2.1.2 Vidrarias, acessórios e equipamentos	36
2.2. Métodos.....	38
2.2.1 Preparação da Base.....	38
2.2.2 Preparação dos Sais.....	39
2.2.3 Óleo de Copaíba.....	42
2.3 Preparo da Nanoemulsão.....	42
2.3.1 Síntese das Formulações.....	42
CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	46
3.1 Avaliação Macroscópica.....	46
3.2 Testes de Estabilidade.....	46

3.3 Análises Microscópicas.....	48
3.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica/EPR.....	49
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1 Caracterização das amostras de Nanoemulsão.....	50
4.2 Teste de Centrifugação e Estresse Térmico.....	51
4.3 Potencial ZetaSizer.....	54
4.4 pH e variação após estresse térmico.....	57
4.5 Condutividade.....	59
4.6 Viscosidade.....	61
4.7 Densidade.....	63
4.8 Avaliação Macroscópica.....	64
4.9. Microscopia Óptica.....	66
4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	69
4.11 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	75
4.12 Análises em EPR.....	76
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO.....	78
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das diferentes formulações de óleo de copaíba, Polissorbato 20, Ácido Oléico, água destilada e nanopartículas.....	44
Tabela 2: Composição das diferentes formulações de óleo de copaíba, Polissorbato 20, Ácido Oléico, água destilada e nanopartículas.....	44
Tabela 3: Centrifugação e Estresse Térmico das Nanoemulsões com Óleo de Copaíba no valor de EHL 12,7.....	53
Tabela 4: D_M , PDI e Potencial Zeta (PZ) de amostras formuladas com Acetato de Zinco.....	54
Tabela 5: D_M , PDI e Potencial Zeta (PZ) de amostras formuladas com Sulfato de Zinco.....	55
Tabela 6: D_M , PDI e Potencial Zeta (PZ) de amostras formuladas com Sulfato de Zinco.....	56
Tabela 7: Avaliação das características Macroscópicas e Microscópicas das diferentes Nanoemulsões formuladas com $ACTZn$ e $SULZn$	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do processo de formação das Nanoemulsões [19].....	20
Figura 2: Representação esquemática de uma molécula de tensoativo com suas partes apolar e polar [23]	24
Figura 3: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas [30].....	26
Figura 4: Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo/água (o/a) e água e óleo (a/o) [40].....	27
Figura 5: Imagem e classificação da Copaíba.: https://www.google.com.br/ adaptado [50].....	29
Figura 6: Árvore <i>Copaifera sp.</i> (A), folhas e frutos (B) e constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba (C) e (D), adaptado [47].....	30
Figura 7: Método de extração do óleo de copaíba-adaptado [55].....	31
Figura 8: Estrutura da molécula de tensoativos e seus diferentes tipos.....	33
Figura 9: Procedimento para síntese e aquecimento para preparação da base.....	38
Figura 10: Equipamentos utilizados para síntese de Nanopartículas, A) Balança de Precisão, B) Aquecedor Magnético, C) Ultrasson.....	39
Figura 11: Processo de síntese da Ferrita de Acetato de Zinco.....	40

Figura 12: Processo de síntese da Ferrita de Sulfato de Zinco.....	41
Figura 13: Procedimento utilizando dispositivos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões: A) Incorporar Óleo em água; B) Misturador de alta velocidade; C) Homogeneizador de Membrana; D) Ultrasson - homogeneizador de Alta Pressão; E) Obtenção das Nanoemulsões <i>O/A</i> adaptado de [85, 86].....	45
Figura 14: Imagens das 12 formulações obtidas, a esquerda com Acetato de Zinco e a direita com Sulfato de Zinco e óleo de Copaíba.	50
Figura 15: Aspecto das amostras apresentando Separação de Fases e Cremeação após Centrifugação.....	51
Figura 16: Valor da variação do <i>pH</i> das amostras de <i>ACTZn</i>	58
Figura 17: Valor da variação do <i>pH</i> das amostras <i>SULZn</i>	59
Figura 18: Variação nos valores da Condutividade nas diferentes amostras de Nanoemulsão.....	60
Figura 19: Valor da Viscosidade das amostras de Nanoemulsão.....	62
Figura 20: Valor do Tempo de Escoamento das amostras de Nanoemulsões.....	63
Figura 21: Valor da Densidade obtidas das diferentes formulações.....	64
Figura 22: Avaliação macroscópica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Acetato de Zinco.....	65

Figura 23: Avaliação macroscópica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Sulfato de Zinco.....	66
Figura 24: Avaliação por microscopia óptica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Acetato e Sulfato de Zinco.....	67
Figura 25: Gotículas do óleo de copaíba. Microfotografias obtidas por MET, com aproximação de 25.000 K (A) e 400.000 K (B).....	69
Figura 26: Microfotografias obtidas por MET –(A) nanopartículas de Acetato de Zinco; (B) – nanopartículas de Sulfato de Zinco.....	70
Figura 27: Tipos de Nanoemulsões segundo os modelos de incorporação de fármacos. Adaptado [98].....	71
Figura 28: Imagens dos glóbulos de ZnSO ₄ na concentração de 0,05g. (A) presença de halo lipídico, (B) NLC tipo II. Microfotografias obtidas por MET.....	71
Figura 29: Imagens de nanoemulsão de ZnSO ₄ na concentração de 1 g/mL,(A) NP com tamanho inferior a 20 nm, (B) NP com formas esféricas e aglomeradas . Microfotografias obtidas por MET.....	72
Figura 30: Nanoemulsão de Acetato na concentração de 0,05 g/mL. (A) NP com formas distintas entre esféricas e irregulares, (B) NP com formas esféricas e alongadas. Microfotografias obtidas por MET.....	73

Figura 31: Nanoemulsão de Acetato na concentração de 1g/ml. (A) Presença de halo lipídico e (B) aglomerado de <i>NP</i> . Microfotografias obtidas por <i>MET</i> , com aproximação de 120.000 K.....	74
Figura 32: Nanopartículas de <i>ACTZn</i> (A) e <i>SULZn</i> (B) diluídas de 1:1000. (A) e (B) textura que confirma a composição da amostra por $ZnFe_2O_4$. Microfotografias obtidas por <i>MEV</i>	75
Figura 33: Relação entre campo e modelo das amostras de Acetato e Sulfato de Zinco.....	77
Figura 34: Valor do tempo de escoamento das amostras de Nanoemulsão.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO.

AP– Água purificada.

ACTZN– Acetato de Zinco.

HBL – Balanço hidrofílico-lipofílico.

EHL– Equilíbrio Hidrofílico-lipofílico.

H(G) – Campo de ressonância.

DM – Diâmetro médio das partículas.

D - Densidade.

IPD – Índice de polidispersividade.

$\Delta H(G)$ – Largura da linha de ressonância.

MEV– Microscopia Eletrônica de Varredura.

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão.

INCI– Modelo de Cristal.

NCL – Modelo de cristalino.

NM – nanômetros.

NP – Nanopartícula Magnética.

O/A– Nanoemulsão óleo em água.

A/O – Nanoemulsão água em óleo.

OCO– Óleo de Copaíba.

PM- Peso molecular.

pH – Potencial Hidrogênio.

PZ- Potencial Zeta.

RPE – Ressonância Paramagnética eletrônica.

SULZN – Sulfato de Zinco *NP*.

ZnSO4 – Sulfato de Zinco.

TAO– Tensoativo ácido oléico.

CAPÍTULO 1

1. Revisão Bibliográfica

As aplicações de nanopartículas funcionalizadas magnéticas funcionalizadas com diversas coberturas (proteínas, óleos, ácidos biocompatíveis), vão desde a escala manométrica para micrométrica e estão em crescente uso na área farmacológica e aplicações médicas [1]. Trata-se de nanopartículas (NP) com tamanhos menores do que 100 nanômetros (nm) que apresentam propriedades físico-químicas específicas, que as diferenciam de materiais com tamanhos maiores. A sua composição química é, principalmente, óxido de ferro (ferritas de cobalto, zinco, níquel, magnetita e maguemita) que pode ser funcionalizado dependendo da aplicação.

As emulsões são amplamente empregadas como veículos nas indústrias cosmética e farmacêutica por apresentarem vantagens como a veiculação de fármacos ou ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam [2].

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), são sistemas de liberação de fármacos cuja matriz é constituída por lipídios sólidos e, ao contrário dos lipossomas, possuem excipientes bem tolerados pela pele, podendo ser empregadas em matérias-primas para o desenvolvimento de formulações cosméticas e farmacêuticas. Dentre as vantagens de seu uso, podemos citar a

capacidade de proteção química de componentes lábeis, possibilidade de liberação controlada e aumento da superfície de contato de substâncias encapsuladas ao extrato córneo, além da não utilização de solventes orgânicos para sua produção e facilidade de aumento de escala [3].

Os óleos vegetais são comumente incorporados em formulações cosméticas emulsionadas, como dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si, que com um tensoativo tornam-se estáveis [4]. São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo, cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento do sistema [5]. (Figura 1).

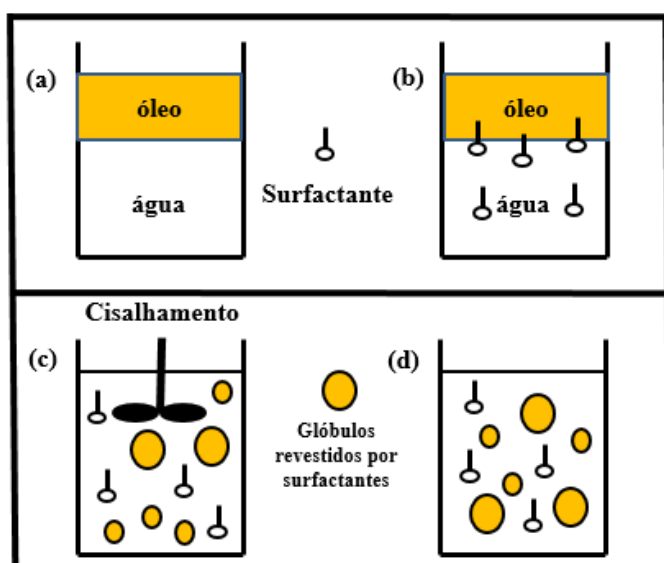


Figura 1: Representação esquemática do processo de formação das Nanoemulsões adaptado de [17].

As nanoemulsões com o diâmetro de gotículas variando entre 20 e 300 nm são mais vantajosas em relação às demais nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade frente à cremeação e sedimentação, utilizarem baixa concentração de tensoativos, serem transparentes

e fluidas e aumentarem a molhabilidade, espalhabilidade e penetração devido à baixa tensão interfacial [6]. São consideradas sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros na preparação [7].

Para o desenvolvimento das nanoemulsões, é necessário levar em consideração alguns quesitos destacados por [8; 9]; como a seleção de uma composição adequada, controlando o fim da adição dos componentes e aplicando o corte de uma forma que rompa eficazmente as gotículas, através da força de cisalhamento.

O óleo-resina de copaíba, que é composto por mais de setenta tipos de moléculas do tipo terpenos e flavonoides é obtida através do caule da árvore (*Copaifera sp.*) [11] de tal forma que pode ser usado no desenvolvimento de colóides magnéticos, polímeros e nanoemulsões magnéticas. Estudos demonstram que o óleo de copaíba possui propriedades antiinflamatórias, antimicrobiana e citotóxica, bem como uma função protetora de feridas cutâneas, ação sobre lesões de pele como cortes ou micoses diversas, são utilizados óxido de zinco [12]. No caso da nanoemulsão magnética desenvolvida para esta pesquisa, nanopartículas de zinco foram funcionalizadas com óleo de copaíba e suspensas adicionando tensoativos, para determinação de seu potencial, estabilidade e viabilidade para tratamentos similares futuros [13].

Na literatura científica, poucos são os trabalhos que relatam o desenvolvimento de fórmulas de nanoemulsões associadas a nanopartículas magnéticas em escala manométrica [34]. Nesta pesquisa, foram sintetizadas nanoemulsões pelo método da coprecipitação em alta temperatura, adicionando-se óleo de copaíba para funcionalização das mesmas, seguindo a metodologia proposta por [33]. As amostras, elaboradas com base em uma metodologia específica [81], foram caracterizadas quanto a estabilidade física e submetidas a análise macro e microscópica e a técnicas de avaliação de viabilidade para uso em tratamento de lesões cutâneas.

1.2 Introdução

Nanoemulsão são parte de uma ampla classe de colóides dispersos multifásicos [13]. São constituídas por glóbulos entre 20 a 500 nm, ou seja, com distribuição granulométrica entre microemulsões e macroemulsões ou emulsões clássicas [14]. As nanoemulsões são obtidas, aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar uma fase líquida fundida em um dispersante quente, com adição de tensoativo, e com resfriamento subsequente para obter o núcleo sólido [15]. Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho do glóbulo é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho é de 200 a 500 nm [16].

As nanoemulsões são preparadas por uma variedade de lipídeos e são estabilizadas por tensoativos biocompatíveis (Figura 1), podendo ser aniônicos, catiônicos ou não iônicos [19].

Vários fatores podem influenciar a obtenção de partículas em diferentes diâmetros tais como: concentração de fármaco e polímeros, quantidade de tensoativo, concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa [18].

A inerente estabilidade das nanoemulsões está relacionada ao emprego de tensoativos não-iônicos e/ou polímeros que conferem estabilização estérica entre os glóbulos, reduzindo a possibilidade de coalescência, bem como pela superação da força da gravidade atuante nesses glóbulos pelo movimento browniano, presente em sistemas, evitando assim processos de instabilidade [20].

Cinco fenômenos de instabilidade química podem ocorrer nas emulsões: cremeação, floculação, coalescência ou coalescência parcial, inversão de fases e *Ostwald ripening* [21].

Os sistemas de Nanoemulsões, assim como Microemulsão são importantes para a formulação de produtos cosméticos da pele e produtos para saúde por apresentar as seguintes características [22]:

- **Tamanho da Partícula:** apresentam tamanho muito reduzido, entre 20 a 500 nm, e isso causa redução da força gravitacional e conseqüentemente o vencimento desta força pelo movimento browniano indica que não ocorrerão processos de cremagem ou sedimentação; evita a floculação mantendo o sistema disperso; evita o processo de coalescência: a espessura da película

evita qualquer ruptura ou espessamento do filme entre as partículas; permite a deposição uniforme nos substratos.

- **Sistemas de Liberação:** sistemas encapsulados para veicular compostos lipofílicos.
- **Baixa Concentração de Tensioativos (5,0 a 10,0%):** ao contrário das microemulsões, não necessitam de alta concentração de tensioativos (Figura 2).
- **Aspecto Sensorial:** apresentam transparência ou fluidez, características muito valorizadas em produtos cosméticos.
- **Baixa Tensão Superficial:** aumentam a molhabilidade, espalhabilidade e penetração.

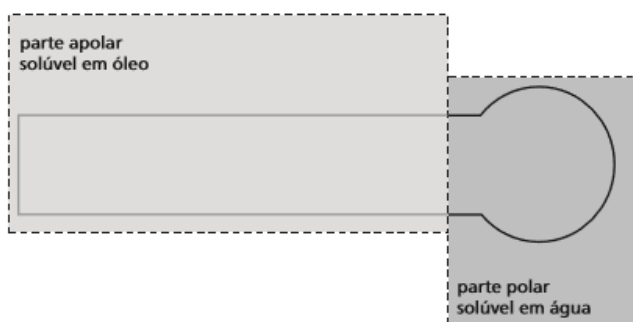


Figura 2: Representação esquemática de uma molécula de tensoativo com suas partes apolar e polar [23].

O surfactante não poderá resultar na formação de fases cristalinas de líquidos liotrópicos “microemulsão” e deverá ser em quantidade que permita o revestimento na área de superfície

das gotículas em nanoescala durante a emulsificação inibindo, desta forma, a coalescência induzida por tensão de corte [23]. A fase de cisalhamento deve ser aplicada para romper as gotas em microescalas em nanogotas pois, o nível de tensão deve atingir a pressão de Laplace de gotículas com tamanho desejado, geralmente de 10 a 100 nm.

As emulsões de glóbulos nanométricos (10 a 100 nm) são formadas aplicando alta quantidade de energia envolvida na formação de interfaces altamente curvas devido a pressão de Laplace [24] e sua elaboração é formado por estresse mecânico [25] sendo seu sistema cineticamente estáveis [16].

A granulometria do sistema também previne o fenômeno da coalescência, pois esses glóbulos não são facilmente deformáveis. A grande espessura do filme interfacial, relativo ao tamanho do glóbulo, previne que a diminuição natural deste filme seja suficiente para causar rompimento do glóbulo [22;26].

O fármaco ou óleo, pode ser encontrado no núcleo na parede lipídica ou disperso homogeneamente na matriz lipídica (Figura 3) [27; 28]. Podem ocorrer também, situações em que o fármaco fica aderido na superfície da partícula [29].

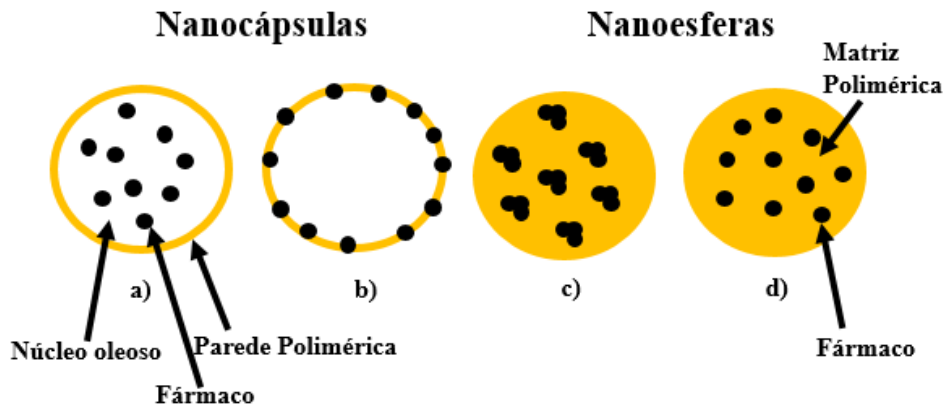


Figura 3: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas, adaptado [30].

1.3 Método de obtenção de Nanopartículas magnéticas e Nanoemulsões

Na literatura científica são encontradas algumas formas de síntese de nanopartículas dentre as quais: irradiação de ultrassom, coprecipitação química, o método sol-gel, a síntese assistida por micro-ondas [31; 32]. A técnica de coprecipitação química destaca pela simplicidade, rapidez e controle do tamanho das partículas e consiste basicamente numa reação entre o precursor e o mineralizante (uma base), sob aquecimento e agitação [33]. Trata-se de uma mistura de sais em ambiente aquoso seguido de precipitação de um hidróxido, esse método consiste de dois processos: a nucleação

(formação de centros cristalização) e o crescimento subsequente das partículas. Quando a nucleação predomina, o resultado é um número grande de partículas pequena [34; 35].

Existem duas formas de emulsões simples (Figura 4), do tipo óleo em água (O/A), na qual as gotículas do óleo estão dispersas na água e a do tipo água em óleo (A/O) na qual as gotículas da água estão dispersas em óleo [21]. Para que ocorra a obtenção de nanoemulsões estáveis, é necessário que duas condições sejam mantidas: a agitação para que ocorra a dispersão de um líquido no outro e a presença de um ou a combinação de agente emulsificantes para estabilizar o sistema [36; 21] o objetivo principal é assegurar uma interação entre o óleo e a água, reduzindo a tensão interfacial do sistema, impedindo assim que a coalescência das gotas ocorra [37; 38]. São considerados sistemas bifásicos líquido-líquido, constituídos geralmente por uma fase aquosa e por uma fase orgânica [39].

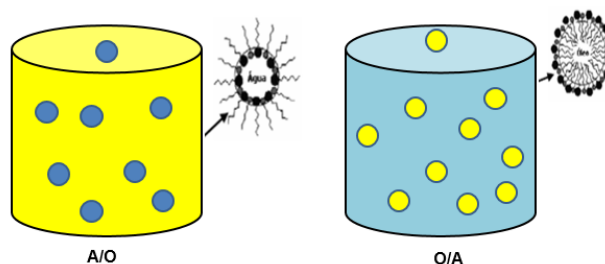


Figura 4: Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo/água (o/a) e água e óleo (a/o) [40].

O balanço hidrofílicolipofílico do tensoativo (*HLB*), é um sistema arbitrário que atribui um número a um componente ou mistura de componentes que se deseja emulsionar e, baseado nele, pode-se escolher o melhor conjunto de emulsionantes [39]. Trata-se de parâmetros criados por [41] em uma escala de *HLB* variando entre 0 e 20, sendo o valor de 10 o limite entre os sistemas lipófilos e hidrófilos. A aplicação de cada tensoativo está relacionada com o valor do seu *EHL*, sendo que os que apresentam baixo *EHL*, são indicados para emulsões água em óleo (*A/O*) e aqueles com valores intermediários são recomendados para sistemas óleo em água (*O/A*) [41; 42; 43; 44].

1.4 Óleo de Copaíba

A copaíba é encontrada no sul da Floresta Tropical, particularmente no Brasil e ocorre predominantemente na região Amazônica [45]. As árvores são de crescimento lento, alcançando de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos [46]. A floração e frutificação ocorrem a partir dos 5 anos após o plantio onde, a floração ocorre no período entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro dependendo da região e do clima local [47].

São classificadas e distribuídas em 72 espécies já identificadas (Figura 5), sendo que em terras brasileiras já foram encontradas 16 espécies [48; 49]. A copaíba (*Copaifera sp.*),

pertencente ao gênero *Copaifera* da família das *Leguminosae-Caesalpinaceae*, é utilizado na medicina popular brasileira como anti-inflamatório das vias superiores e urinárias, tendo aplicação mais ampla como do antisséptico [47]. O óleo é um recurso medicinal alternativo e já está incorporado a uma cultura, pelas populações ribeirinhas, tanto para uso quanto para atividade terapêutica.

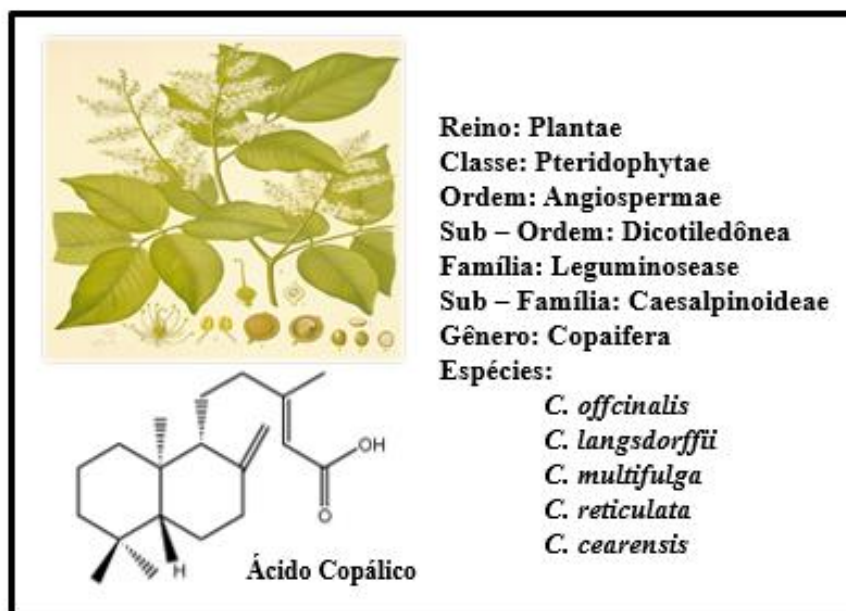


Figura 5: Imagem e classificação da Copaíba. Fonte: <https://www.google.com.br/> adaptado [50].

A planta é constituída por sesquiterpenos e diterpenos (Figura 6) que são responsáveis pelo aroma e atividade antiinflamatória [51; 45]. Nos óleos de copaíba, poucos constituintes ativos identificados foram testados isoladamente, como o β -bisabolol (anti-inflamatório) e o β cariofileno (bactericida, antitumoral e anti-inflamatório) (Figura 6). É erroneamente

chamado de bálsamo da copaíba, apesar de não ser um bálsamo verdadeiro uma vez que não apresenta na sua composição ácido benzóico ou cinâmico [46].

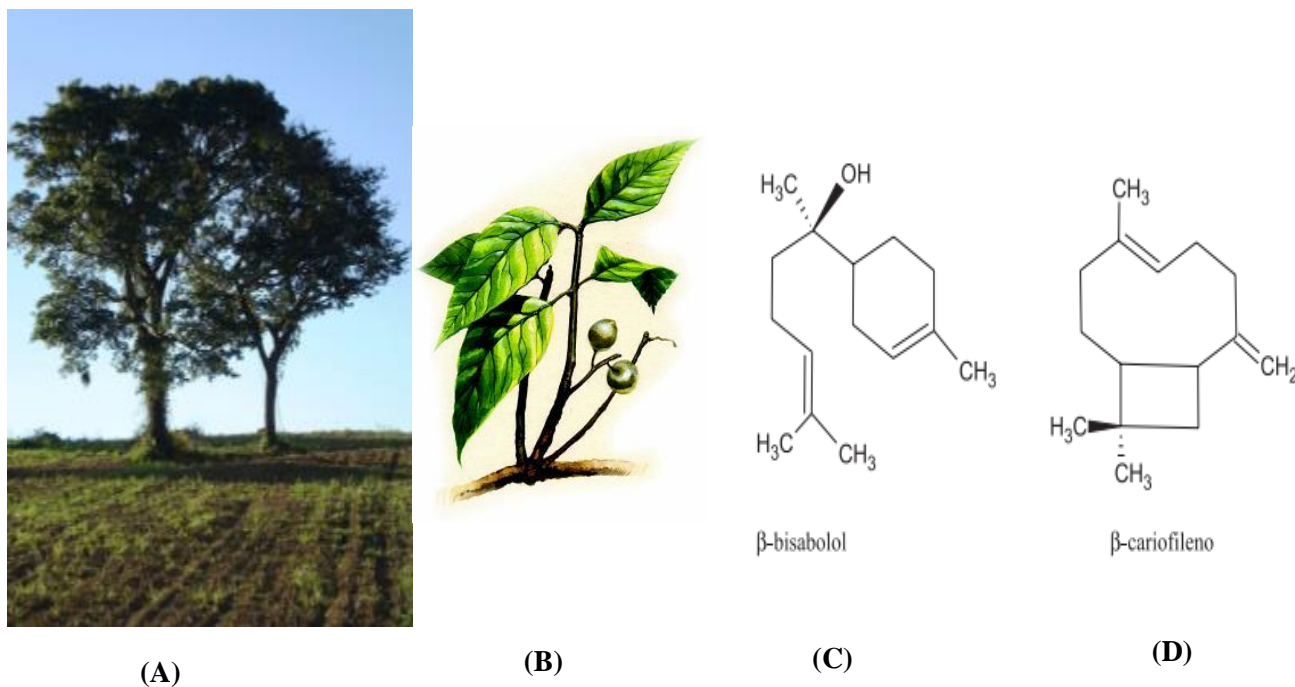


Figura 6: Árvore *Copaifera sp.* (A), folhas e frutos (B) e constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba (C) e (D), adaptado [47].

Estudos realizados por [52] mostraram que o óleo de copaíba também possui efeitos antifúngicos apresentando uma boa atividade contra algumas espécies, como *Aspergillus flavus* e *Candida parapsilosis*. O óleo tem função medicinal como antibiótico e antiinflamatório, sendo usado como cicatrizante de feridas e úlceras, contribuindo no tratamento de dermatoses e psoríase [53; 54].

O óleo-resina pode ser obtido (Figura 7), através da perfuração no tronco da copaibeira [55; 56; 47; 57]. O óleo extraído pode variar em relação à concentração e

natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes [47; 58; 55], de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos ou fatores abióticos (solo, temperatura, luminosidade, disponibilidade de água), embora alguns indiquem que não tenham apresentado diferença significativa na composição de óleos extraídos das mesmas árvores, em épocas sazonais diferentes [59; 60; 61; 58].



Figura 7: Método de extração do óleo de copaíba-adaptado [55].

O óleo de copaíba tem sido utilizado por mais de 500 anos na medicina tradicional popular, com uma grande diversidade de aplicações importantes tais como antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana contra uma grande diversidade de microrganismos, apresenta um potencial de uso como agente fungistático em curto período de tempo [55; 52] e cicatrizante sobre diferentes tecidos do corpo [62; 63].

1.5 Acetato de Zinco ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}_2\text{H}_2\text{O}$) e Sulfato de Zinco (ZnSO_4)

O Zinco é um metal que intervém no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, estimula a atividade de mais de 100 enzimas, colabora para o funcionamento do sistema imunológico e é necessário para a cicatrização dos ferimentos. Em feridas de ratos diabéticos tratados com suplementos a base de zinco, constatou-se a eficácia no processo de cicatrização de feridas cutâneas [64]. Utilizando-se óxido de zinco para tratamento endodôntico, é possível constatar que o mesmo funciona como substância capeadora mantendo a vitalidade da raiz [65]. O óxido de zinco estimula a cicatrização de feridas [66] possuindo também atividade antiinflamatória pois é essencial para a enzima antioxidante *SOD-1* (superóxido dismutase citosólica), responsável por reduzir o radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio [67]. O mesmo autor evidencia que a suplementação com zinco quando comparada ao uso de antibiótico administrado por via oral apresenta a mesma ação terapêutica.

O sulfato de zinco é um cristal ou grânulo incolor e inodoro, solúvel em água e, em meio aquoso, possui pH 4,5 e fórmula química é $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Alguns trabalhos referem eficácia terapêutica com sulfato de zinco na alopecia (perda de cabelo), prurido urêmico, leishmaniose cutânea, perifoliculite *capitis* [68] e acne inflamatória [69]. A suplementação com zinco reduz os níveis teciduais de citocinas inflamatórias em quadros diarreicos [70].

Em vários estudos nos EUA e outras regiões, uma pequena proporção de crianças com idade

superior a 4 anos apresenta uma baixa concentração de zinco, associado a falta de apetite, atraso no crescimento e prejuízo no paladar (*hipogeusia*). O tratamento com zinco melhora o apetite, o paladar se torna normal e ocorre o retorno ao crescimento, melhora na imunidade mediada por células e na cicatrização de feridas [71].

1.6 Tensoativos Lipofílicos e Hidrofílicos

O tensoativo, por apresentar características hidrofílica e lipofílica na mesma molécula, nunca apresenta total estabilidade na sua dissolução, seja em meio polar (água) ou apolar (óleo). É essa instabilidade que proporciona aos tensoativos características diferenciadas dos outros compostos [23]. Na Figura 8, estão definidos os tipos de tensoativos, onde a polaridade é a principal característica a ser levada em conta quando se escolhe para uma determinada aplicação.

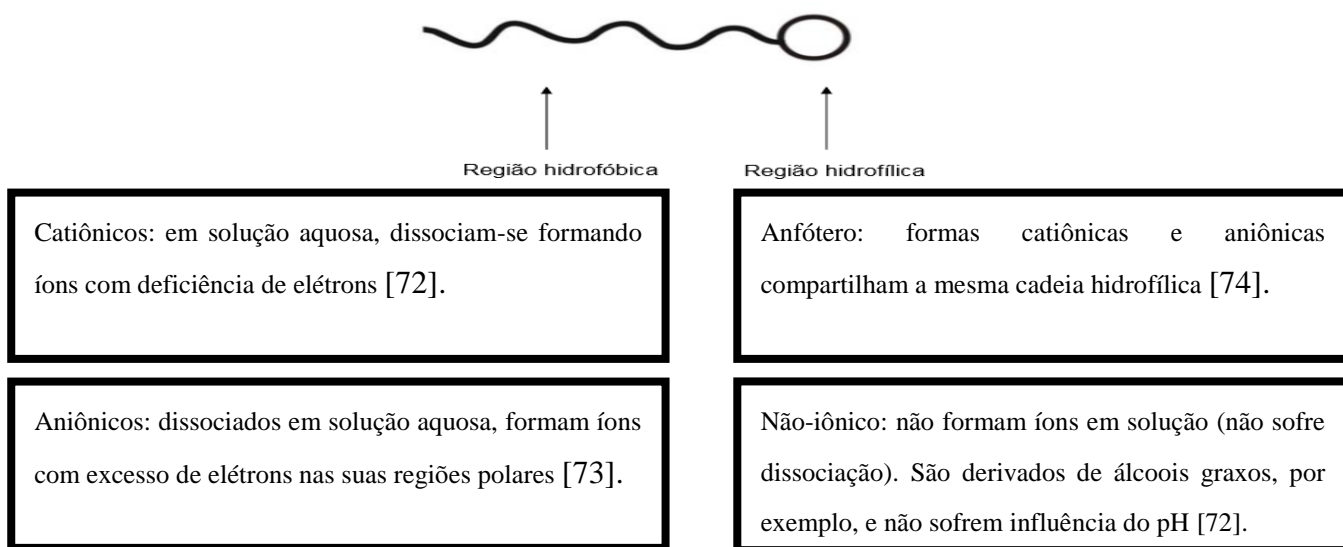


Figura 8: Estrutura da molécula de tensoativos e seus diferentes tipos.

1.7 Tensoativo Hidrofílico (não iônico)

Os tensoativos não iônicos, por não possuírem carga verdadeira, formam gotículas que não apresentam dupla camada elétrica e a estabilização das emulsões ocorrem pelo impedimento estérico de suas moléculas com partes polares, geralmente, longas [24]. O tensoativo de escolha para as formulações foi o *Polissorbato 20*, denominado Monolaurato de Sorbitano etoxilado 20 *OE* -sigla Tp20, apresenta Massa Molar (g/mol) de 1.227,54 g/mol e comercialmente é chamado de *Tween 20*.

Trata-se de tensoativos não iônicos do grupo dos polioxietileno-sorbitanos (*Tweens*) que têm se mostrado promissores em combinação com os fosfolipídeos, pois levam a formação de filmes mistos compactos, conferindo maior estabilidade à formulação [75; 76; 77].

1.8 Tensoativo Lipofílico

O ácido oleico é um ácido gordo que ocorre naturalmente em várias gorduras animais e óleos vegetais. É um óleo inodoro e incolor, apesar de apresentar uma coloração amarelada em algumas amostras comerciais. Trata-se de um ácido carboxílico, pois possui um grupo funcional *COOH*, é considerado um ácido gordo de cadeia longa, possuindo 18 carbonos na sua estrutura [78] que participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese de hormônios [79]. É utilizado na síntese das nanoemulsões pois

ajuda a manter a integridade dos glóbulos e a aglomeração das nanopartículas [80].

Apresenta Massa Molar (g/mol) 282,4614 e denominação química Ácido cis-9-octadecenóico.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

As Ferritas de Acetato de Zinco e Sulfato de Zinco foram sintetizadas separadamente utilizando os materiais listados abaixo. As Nanoemulsões foram desenvolvidas em fase distinta de preparação, utilizando reagentes e equipamentos descritos a seguir.

2.1.1 Matérias-primas, Reagentes, Solventes

- Água destilada
- Hidróxido de Sódio (micropérolas)
- Acetato de Zinco
- Sulfato de Zinco
- Óleo de Copaíba
- Cloreto de Ferro
- Polissorbato 20 (*Tween 20*)
- Ácido Oléico

2.1.2 Vidrarias, acessórios e equipamentos

- Cadinho e pistilo
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de centrífuga

- Tubos de ensaio
- Tubos de sonicação
- Béquer de 500 mL
- Béquer de 1000 mL
- Bastão de vidro
- Homogeneizador elétrico
- Agitador magnético, *TE085*
- Analisador de partículas Malvern, Zetasizer Nano ZS
- Balança analítica – Mod. H51
- Microscópio óptico marca Olympus
- Centrífuga Fanen, Excelsa Mod. 206 BL
- pHmetro de bancada. Digimed-Mod. DM-23
- Ultrassom, Unique Ultrasonic Cleaner, Mod. VSC 2800^a
- Vórtex QL-901
- Condutivímetro

2.2 Métodos

As etapas de síntese das Ferritas de Zinco foram separadas em etapas de preparação da base, preparação dos sais em diferentes proporções e preparação das nanoemulsões que serão descritas a seguir.

2.2.1 Preparação da Base

Para preparação da base, foi utilizado o Hidróxido de Sódio ($NaOH$) em forma de lentilhas, com $PM= 40,00$ e água destilada. Foram pesados 144,052 g de Hidróxido de Sódio em lentilhas e adicionado água destilada até completar um volume de 600ml com pH 7,0. Em seguida foi feito o aquecimento até atingir uma temperatura de 65 °C. A solução resultou em um líquido transparente (Figura 9).

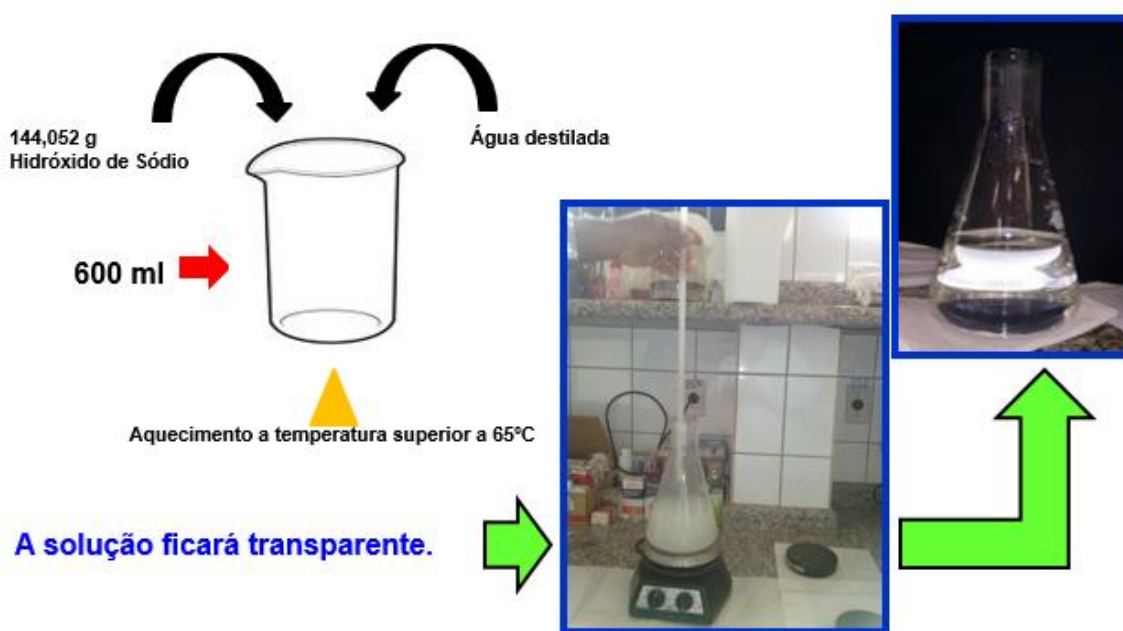


Figura 9: Procedimento para síntese e aquecimento para preparação da base.

2.2.2. Preparação dos Sais

A preparação dos sais para obtenção de Ferrita de Zinco foram utilizados o Cloreto de Zinco ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) $PM= 270,30$, Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $PM= 287,56$, Acetato de Zinco ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $PM= 219,49$. Na balança de precisão, após ter sido calibrada, foram realizadas as pesagens dos seguintes sólidos: Hidróxido de Sódio, Cloreto de Zinco, Sulfato de Zinco e Acetato de Zinco. Para a separação, pesagens e homogeneização foi necessário o uso das seguintes vidrarias: béquer (100 mL, 300 mL, 1000 mL), erlemeyer (1000 mL), espátula de metal, termômetro, tiras para mensurar o pH . Aquecedor, Ultrasson e homogeneizadores mecânicos (Figura 10). Os usos de ímãs foram necessários para a sedimentação das nanopartículas.

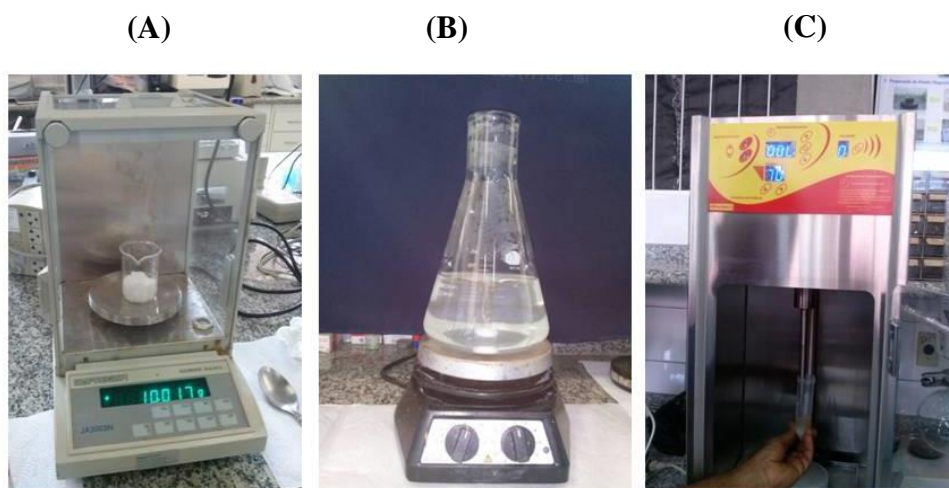


Figura 10: Equipamentos utilizados para síntese de Nanopartículas, A) Balança de Precisão, B) Aquecedor Magnético, C) Ultrasson.

Acetato de Zinco na proporção 1:2

Foram pesados 10 g de Cloreto de Ferro e adicionados 20 g de Acetato de Zinco. Adicionou-se água destilada até cobrir a superfície. A mistura foi aquecida até atingir a temperatura de 60 °C e ainda em processo de aquecimento, adicionou-se a base também a temperatura aproximada de 80 °C. Após observar a precipitação, a solução foi colocada sob ímã para ocorrer precipitação (Figura 11). O *pH* mensurado foi de 2,0.



Figura 11: Processo de síntese da Ferrita de Acetato de Zinco.

Sulfato de Zinco na proporção 2:1

Foram pesados 20 g de Cloreto de Ferro e adicionados 10 g de Sulfato de Zinco ($PM=287,56$). A mistura dos sais foi coberta com água destilada até a superfície e levada ao aquecimento atingindo temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pH mensurado foi de 14. Foi adicionado à mistura parte da base, cerca de 150 mL, ainda em processo de aquecimento atingindo $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 12). Após observar a precipitação, a solução foi colocada sob um ímã por aproximadamente 12 horas.



Figura 12: Processo de síntese da Ferrita de Sulfato de Zinco.

2.2.3 Obtenção do óleo de Copaíba

O óleo de copaíba utilizado para o desenvolvimento das formulações foi extraído manualmente da espécie *Copaifera langsdorfii*, que apresenta como características físicas de líquido translúcido, de viscosidade moderada e coloração variável, de amarelo escuro a marrom claro.

2.2.4 Tensoativos utilizados

Foram utilizados como surfactantes o Ácido Oleico (Monooleato de Sorbitano) e *Tween* 20 (Polissorbato 20). Para manter a estabilidade, das nanoemulsões, foi necessária a realização dos testes de estabilidade, que serão mostrados posteriormente.

2.3 Preparo das Nanoemulsões

2.3.1 Síntese das formulações

As formulações de Nanoemulsões foram desenvolvidas baseadas no método utilizado por [81; 82; 83]. Ambas as fases oleosas e aquosas foram aquecidas a temperatura de 75 ± 2 °C. A fase aquosa foi adicionada a fase oleosa sob agitação contínua até o resfriamento em temperatura ambiente à 25 ± 3 °C.

A fase oleosa, representada pelo óleo de copaíba, foi adicionado a tensoativos e homogeneizada por agitação manual. Em seguida, a fase aquosa (água destilada) foi

adicionada a fase oleosa para homogeneização por agitação manual em temperatura ambiente (25±2 °C).

A formulação para determinação do *EHL* (equivalente hidrofílico lipofílico) do óleo de Copaíba foi obtida pelo protocolo utilizado por [81; 83] onde o *EHL* que determina a estabilidade da nanoemulsão formuladas com *Tween 20* e *Span 80* foram entre 12,7 e 15,7. O *EHL* do polissorbato 20 (*tween 20*) é de 16,7. Os polissorbatos (*tweens*) tem valores compreendidos entre 9,6 e 16,7 [84].

Para calcular a proporção utilizada de tensoativos lipofílicos e hidrofílicos foi utilizada a equação 1 e 2.

$$A+B=100 \quad \text{Equação 1}$$

$$EHL_A \times 0,01 \cdot A + EHL_B \times 0,01 \cdot B = EHL_R \quad \text{Equação 2}$$

A= porcentagem do tensoativo hidrofílico;

B=porcentagem do tensoativo lipofílico

EHL_A=Equilíbrio Lipofílico de *A*;

EHL_B= Equilíbrio Hidrofílico de *B*;

Óleo de Copaíba.....10,0%

Tween 20.....A%

onde: A+B=12,7%

Ácido oleico.....B%

Água destilada.....77,3%

Foram obtidas 12 formulações com a mesma composição e quantidade de água destilada, tensoativos e Óleo de Copaíba diferindo-se, apenas, na concentração de Nanopartículas como estabelecido nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Composição das diferentes formulações de óleo de copaíba, Polissorbato 20, Ácido Oléico, água destilada e nanopartículas.

Formulações	OCO/ml	AP/ml q.s.p	Tp20+TAO/ml	NANOP/g
Acetato de Zinco 1	10,0	100,0	12,7	0,005
Acetato de Zinco 2	10,0	100,0	12,7	0,01
Acetato de Zinco 3	10,0	100,0	12,7	0,03
Acetato de Zinco 4	10,0	100,0	12,7	0,05
Acetato de Zinco 5	10,0	100,0	12,7	0,1
Acetato de Zinco 6	10,0	100,0	12,7	1

Legenda: *OCO* – óleo de copaíba; *AP* – água purificada; *Tp20* – polissorbato 20; *Tao* – ácido oleico; *Nanop* – nanopartícula de acetato de zinco.

Tabela 2: Composição das diferentes formulações de óleo de copaíba, Polissorbato 20, Ácido Oléico, água destilada e nanopartículas.

Formulações	OCO/ml	AP/ml q.s.p	Tp20+TAO/ml	NANOP/g
Sulfato de Zinco 1	10,0	100,0	12,7	0,005
Sulfato de Zinco 2	10,0	100,0	12,7	0,01
Sulfato de Zinco 3	10,0	100,0	12,7	0,03
Sulfato de Zinco 4	10,0	100,0	12,7	0,05
Sulfato de Zinco 5	10,0	100,0	12,7	0,1
Sulfato de Zinco 6	10,0	100,0	12,7	1

Legenda: *OCO* – óleo de copaíba; *AP* – água purificada; *Tp20* – polissorbato 20; *Tao* – ácido oleico; *Nanop* – nanopartícula de Sulfato de Zinco.

O procedimento do uso de ultrassom para a preparação de nanoemulsões (Figura 13) geralmente consiste em primeiramente conduzir o fluido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória, na qual sofre impacto [84].

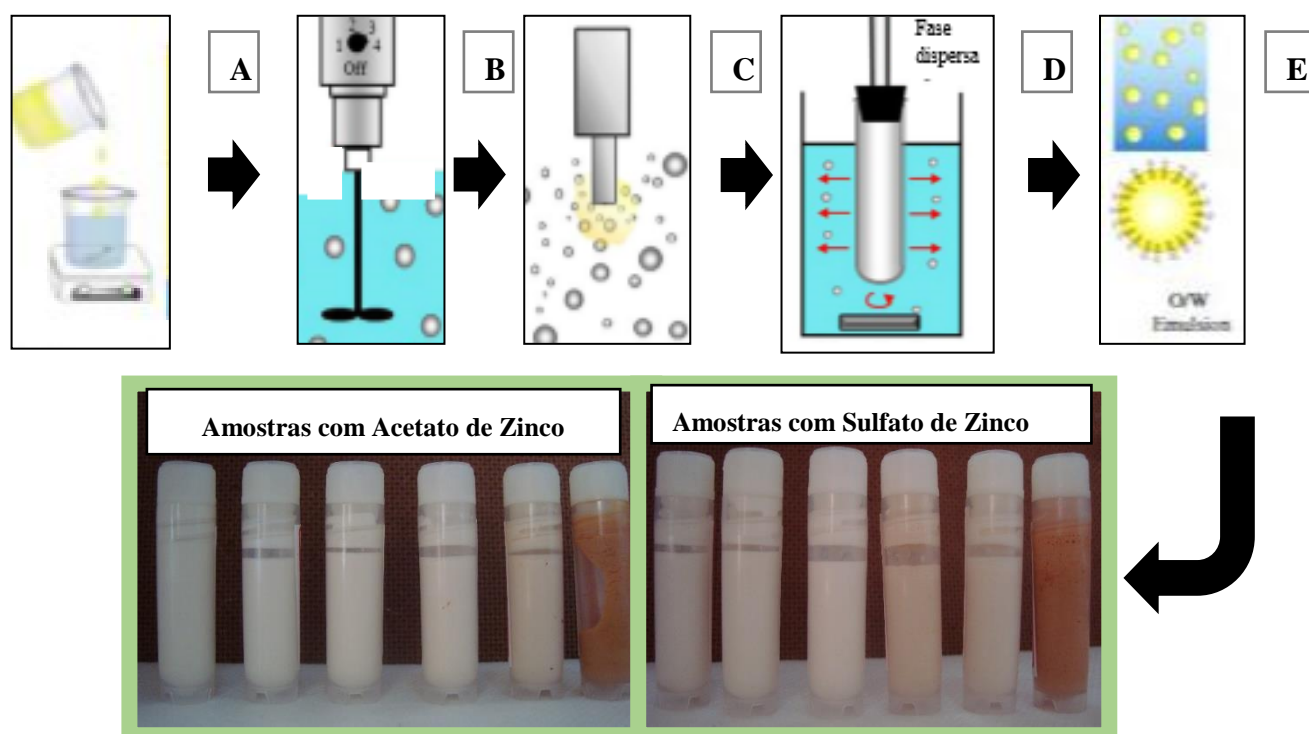


Figura 13: Procedimento utilizando dispositivos mecânicos de alta energia para produção de nanoemulsões: A) Incorporar Óleo em água; B) Misturador de alta velocidade; C) Homogeneizador de Membrana; D) Ultrassom - homogeneizador de Alta Pressão; E) Obtenção das Nanoemulsões O/A (adaptado de [85, 86]).

CAPITULO 3 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização das nanoemulsões foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: potencial zeta/sizer, valor do *pH*, viscosidade, condutividade, densidade, cor, centrifugação, estresse térmico e espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (*EPR*). Foram também realizadas análises em microscopia óptica, eletrônica de transmissão e de varredura.

3.1 Avaliação Macroscópica

Esta avaliação seguiu a metodologia adotada por [87], onde foram avaliados sinais de instabilidade após vinte e quatro horas de realização do preparo das formulações. Foram analisados sinais de cremeação ou de separação de fases, além de aspectos físicos como translucência, fluidez e reflexo azulado.

3.2 Testes de Estabilidade

- **Cor**

Observação da variação de cores entre as formulações quanto a serem opacas ou translúcidas.

- **Teste de Centrifugação**

Foram colocadas em tubos de vidro graduado 5 g de cada amostra e submetidas a centrifugação nas velocidades de 980 rpm, 1800 rpm e 3000 rpm, de acordo com o protocolo estabelecido pela [88].

- **Estresse térmico**

Foram colocadas em diferentes frascos, 10 g de cada amostra. Os frascos foram submetidos a aquecimento na faixa de 5 °C a 50 °C, aumentando a temperatura de 5 em 5 °C até atingir a temperatura final de 50 °C. As amostras foram analisadas quanto a ocorrência ou não de separação de fases ou modificações. Para aquecimento, utilizou-se aparelho de banho ultratermostático (Nova Técnica Modelo 281 NT).

- **Granulometria/Potencial Zeta**

Foram empregados testes para identificar o diâmetro das partículas, índice de polidispersividade (*IPD*) e potencial zeta. Os experimentos foram realizados usando o aparelho Zetasizer/Nanoseries Z590 da marca Malvern, do Instituto de Biologia da UnB.

- **Determinação do valor do *pH***

Para a determinação do *pH* das amostras, foi utilizado o peagômetro marca Analion, modelo PM-608. A avaliação foi feita antes e depois as formulações serem submetidas ao estresse térmico.

- **Condutividade**

Para a avaliação da condutividade, as nanoemulsões a temperatura de 25 ± 2 °C foram separadas em diferentes frascos e adicionado o eletrodo diretamente nas amostras. Foi utilizado um condutivímetro (Digimed, Modelo CD-20) calibrado com solução de *KCl* 0,1N [89; 44].

- **Viscosidade**

Para a avaliação da viscosidade, foi realizada a análise por método manual, depositando-se fração da formulação em funil de acrílico, cronometrando-se o tempo de escoamento.

- **Densidade**

Para obtenção dos valores de densidade, utilizou-se a massa de cada formulação, em relação ao volume total da solução obtida de 50 mL ($D=m/V$).

3.3 Análises Microscópicas

- **Microscopia Óptica**

Para a análise microscópica, foi utilizado um microscópio óptico da marca Olympus CX-31, para a observação da homogeneidade e morfologia da dispersão. Uma gota de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e recoberta com uma lamínula. Todas as lâminas foram analisadas na objetiva de 40x.

- **Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão (MEV e MET)**

As amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão e Varredura do Instituto de Biologia da UnB. As amostras foram diluídas de 1:1000 em água destilada. Em seguida foram colocadas na placa para secagem em temperatura ambiente por 12 horas.

3.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Todas as amostras foram medidas em *EPR BRUKER* modelo *ELEXSYSII E580* para detectar o comportamento paramagnético das nanopartículas inseridas nas formulações. Foram realizadas avaliações quanto a variação da ressonância com o comportamento de linha de ressonância nas diferentes amostras comparadas com Acetato de Zinco e Sulfato de Zinco. As análises foram realizadas no Instituto de Física no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica da UnB.

CAPITULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentamos os resultados das medidas de caracterização física das amostras, sendo elas: Teste de Centrifugação e Estresse Térmico, Potencial Zetasizer, *pH* e variações após Estresse Térmico, Condutividade, Viscosidade, Densidade, Análises Macroscópicas, Análises em Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura e por *EPR*.

4.1 Caracterização das Amostras de Nanoemulsão

Foram obtidas 12 formulações divididas em dois grupos (Figura 14): Formulações com Acetato de Zinco e Formulações com Sulfato de Zinco. As mesmas diferenciam-se pela concentração das nanopartículas: 0,005 g, 0,01 g, 0,03 g, 0,05 g, 0,1 g e 1 g. A medida que a concentração aumenta, a coloração e viscosidade das nanoemulsões também alteraram e isso também afeta a estabilidade quanto a floculação e cremeação apresentada nas análises microscópicas.

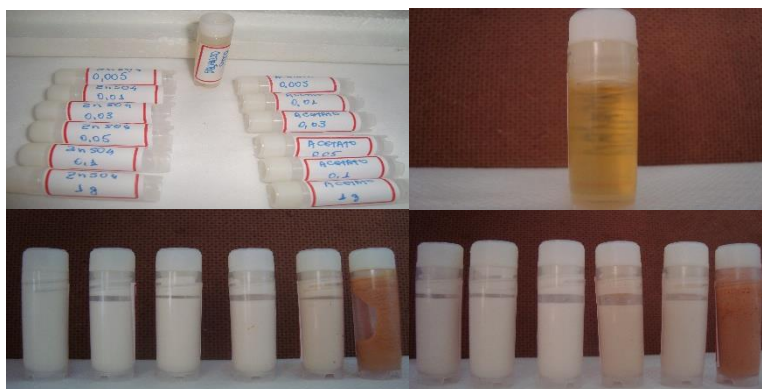


Figura 14: Imagens das 12 formulações obtidas, a esquerda com Acetato de Zinco e a direita com Sulfato de Zinco e óleo de Copaíba.

4.2 Teste de Centrifugação e estresse térmico

Após o teste de centrifugação e análise macroscópica das nanoemulsões, evidenciou-se a separação de fases na velocidade de 980 rpm a partir da concentração de 0,1 g para formulações com Acetato e na mesma velocidade em concentrações 0,05 g para Sulfato de Zinco. Isso comprova que as amostras com Acetato mantiveram sua estabilidade a esta velocidade em um maior número de formulações. A partir da velocidade de 1800 rpm, todas as formulações apresentaram-se levemente modificadas e na velocidade de 3000 rpm todas as formulações sofreram separação de fases (Figura 15).

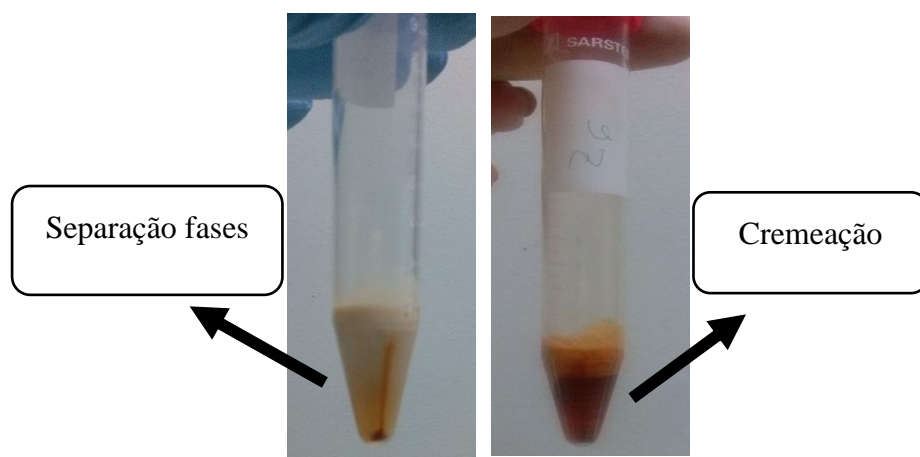


Figura 15: Aspecto das amostras apresentando Separação de Fases e Cremação após Centrifugação.

Todas as amostras compostas por nanopartículas de Acetato e Sulfato de Zinco apresentaram-se estáveis a temperatura limite de 40 °C (Tabela 3). Quando submetidas ao estresse térmico, duas delas apresentaram modificações à temperatura de 45 °C: Uma, nas

formulações de Acetato com concentração de 0,1 g e 1,0 g e uma amostra nas concentrações de 0,05 g, 0,1 g e 1 g, para formulações desenvolvidas com Sulfato de Zinco. Estudos realizados por [81] demonstraram equivalente resultado com nanoemulsões de óleo de gergelim, assim como em nanoemulsões formuladas a partir de óleo de maracujá e lavanda, que não ocorreram modificações quando submetidas a temperaturas de até 65 °C [44;81].

Tabela 3: Centrifugação e Estresse Térmico das Nanoemulsões com Óleo de Copafba no valor de *EHL* 12,7.

FORMULAÇÃO	Centrifugação rpm			Estresse térmico (°C)								
	980	1800	3000	5°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
A 0,005	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
A 0,01	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
A 0,03	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
A 0,05	N	M	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
A 0,1	LM	M	M	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
A 1	M	M	M	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
S 0,005	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
S 0,01	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
S 0,03	N	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	N	LM
S 0,05	LM	LM	M	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
S 0,1	M	M	M	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
S 1	M	M	M	N	N	N	N	N	N	N	LM	M

Legenda: *N* – normal; *LN* – levemente modificada; *M* – modificada.

4.3 Potencial ZetaSizer

Os dados apresentados são a relação do diâmetro médio D_M , índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (PZ) das concentrações formuladas a temperatura ambiente à 25 °C para nanoemulsões à base de $ACTZn$ (Tabela 4). As medidas foram realizadas após um período de 6 meses da síntese.

Na Tabela 4 observa-se que D_m e PDI decrescem com a concentração de nanopartículas na nanoemulsão. Já o PZ aumenta com a concentração de nanopartículas na nanoemulsão de $ACTZn$. Este comportamento sugere que há uma boa estabilidade da nanoemulsão de $ACTZn$. A medida do PZ não houve grandes alterações, em média o valor foi de ± 30 , sendo bom indicativo de estabilidade para $ACTZn$ [90].

Tabela 4: D_M , PDI e Potencial Zeta (PZ) de amostras formuladas com Acetato de Zinco.

Amostras	Diâmetro Médio (nm)	PDI	PZ (mV)
A 0,005	941,8	1	-29,7
	1107	0,976	-29,8
	1190	0,824	-30
A 0,01	669,2	0,845	-33,2
	708,8	0,849	-32,7
	593,7	0,685	-33,4
A 0,03	570,3	0,223	-32,6
	561,3	0,148	-31,1
	589,8	0,177	-32
A 0,05	480,9	0,383	-31,1
	636,6	0,112	-31,6
	631,8	0,105	-30,6
A 0,1	717,6	0,127	-33,7
	830	0,098	-33,4
	808,7	0,101	-33,9

A 1	276,1	0,395	-38,7
	412,5	0,116	-39,6
	381,6	0,217	-38,4

Na Tabela 5 observa-se que D_m sofre uma flutuação de valores maiores para valores menores com o aumento da concentração de nanopartículas na nanoemulsão de *SULZn*. Por outro lado, observa-se que o *PDI* decresce continuamente com a concentração de nanopartículas na nanoemulsão de *SULZn*. Todavia o *PZ* sofre flutuação com o aumento da concentração entre - 38,5 % e - 0,211 %. Sugerindo uma instabilidade na nanoemulsão *SULZn*.

Tabela 5: D_m , *PDI* e Potencial Zeta (*PZ*) de amostras formuladas com Sulfato de Zinco.

Amostras	Diâmetro Médio (nm)	PDI	PZ (mV)
Zn 0,005	1128	0,992	-34,3
	696,7	0,617	-38,5
	731,4	0,675	-36,4
Zn 0,01	419,4	0,695	-0,211
	428,6	0,603	-0,365
	454,3	0,511	-0,296
Zn 0,03	446,1	0,564	-32
	484,6	0,557	-33,3
	444,4	0,547	-32,6
Zn 0,05	623,4	0,297	-29
	625,2	0,436	-30
	618,3	0,451	-29,2

Zn 0,1	755,3	0,149	-28,6
	782,4	0,054	-29,3
	674,5	0,211	-28,3
Zn 1	693,9	0,083	-29,2
	716,8	0,068	-28,5
	698,3	0,133	-27,8

As análises comparativas de D_M , PDI e PZ nas amostras de Acetato e Sulfato de Zinco dispersas em meio aquoso, demonstram que o D_M tem valores considerados maiores do que os da nanoemulsão em ambos os casos (Tabela 6). O PZ nas Nanopartículas não suspensas foi baixo, em torno de -14,4 mV.

Tabela 6: D_M , PDI e Potencial Zeta (PZ) de amostras formuladas com Sulfato de Zinco.

Amostras	Diâmetro Médio (nm)	PDI	PZ (mV)
Acetato Zn Puro	2789	0,965	-15,3
	2338	0,845	-14,1
	2202	0,529	-13,9
Sulfato de Zn Puro	781,8	0,714	-13,8
	700,3	0,382	-14,4
	689,6	0,554	

4.4 PH e variações após estresse térmico

O valor do *pH* é um parâmetro de monitoramento da estabilidade em emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final [44]. Em nanoemulsões formuladas com óleos vegetais, é natural que ocorra uma diminuição do *pH* em decorrência da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres, reduzindo o *pH* do meio [92].

As amostras não apresentaram alterações significativas de *pH* após serem submetidas ao estresse térmico (Figura 16), independentemente de serem constituídas por acetato ou sulfato de zinco. Em um estudo realizado [81] em nanoemulsões formuladas com óleo de gergelim e framboesa, o *pH* diminuiu progressivamente para menos que 4,0, devido a degradação química dos componentes como liberação de ácidos carboxílicos na fase oleosa e tensoativos. As emulsões preparadas com óleos vegetais podem exibir um decréscimo do *pH* devido a hidrólise dos ésteres de ácidos graxos em ácidos graxos livres que é o produto majoritário de degradação [93]. As nanoemulsões preparadas com Óleo de Copaíba mantiveram estáveis os valores do *pH* até 90 dias.

A pele apresenta *pH* levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície [94] e todas as amostras formuladas, caso

seja utilizada para testes *in vivo*, apresentam um *pH* compatível com a pele. A determinação e o controle do *pH* cutâneo, sob o ponto de vista cosmético e/ou dermatológico, são de extrema utilidade, uma vez que o contato com substâncias agressivas, como detergentes, costuma ser frequente, ou até mesmo para evitar a utilização de produtos tópicos inadequados [95].

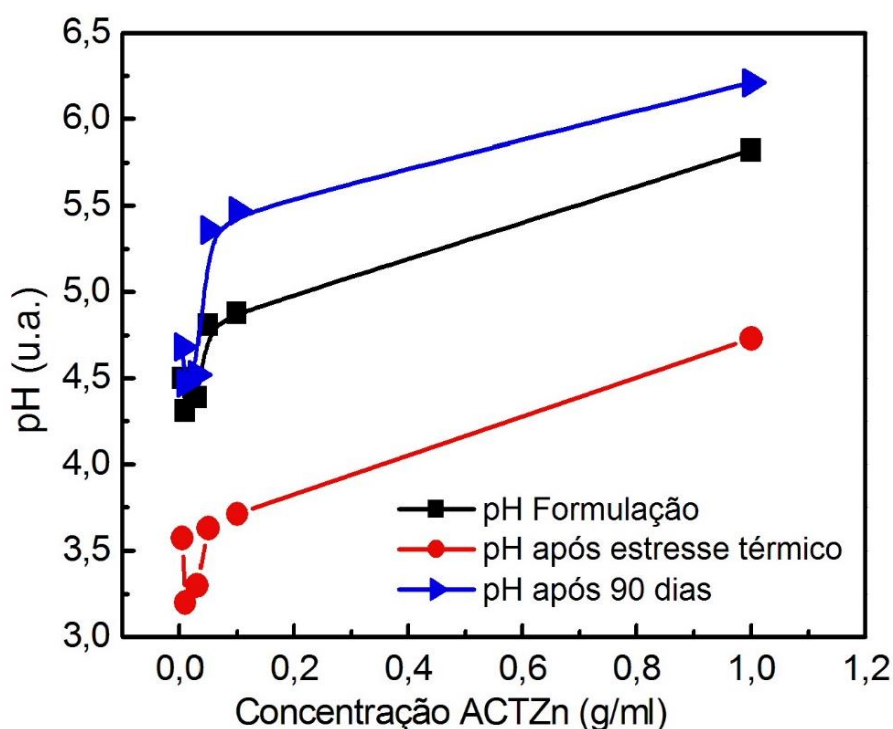


Figura 16: Valor da variação do *pH* das amostras de *ACTZn*.

A Figura 18 ilustra o valor de *pH* das nanoemulsões em temperatura ambiente (25°C) mostra que o *pH* aumenta com a concentração de nanopartículas nas nanoemulsões. Pode-se observar que não ocorre variações entre as amostras de *ACTZn* e *SULZn* (Figura 17).

O valor do pH após 90 dias não houve alterações significativas e os valores após estresse térmico diminuíram para as amostras $ACTZn$ e $SULZn$.

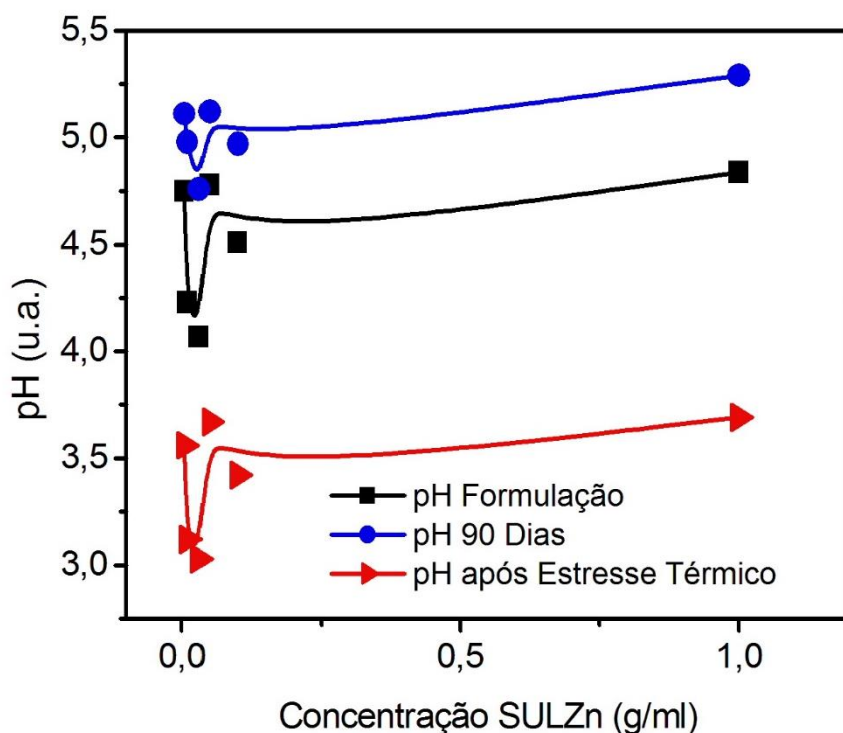


Figura 17: Valor da variação do pH das amostras $SULZn$.

4.5 Condutividade

A Figura 18 apresenta os valores da Condutividade em relação a concentração, confirmando a queda no valor da condutividade em relação ao aumento das concentrações de Nanopartículas em ambas as amostras de Acetato e Sulfato. Os valores obtidos de condutividade térmica foram pouco alterados com o aumento da concentração das amostras de Acetato de Zinco e se apresentaram estáveis nas amostras formuladas com Sulfato de

Zinco. Como a quantidade de óleo presente é a mesma, acredita-se que os valores, pouco alterados, se deva a concentração de Nanopartículas inseridas em cada amostra, já que, os valores de condutividade elétrica são proporcionais à quantidade de óleo essencial contida na formulação pois, quanto maior é a quantidade de óleo, menor é a tendência de ocorrência de dispersão de condução da corrente elétrica [44]. Pode ser considerado um parâmetro indicativo de instabilidade e influenciar na granulometria das emulsões, uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição com a agregação dos glóbulos [96].

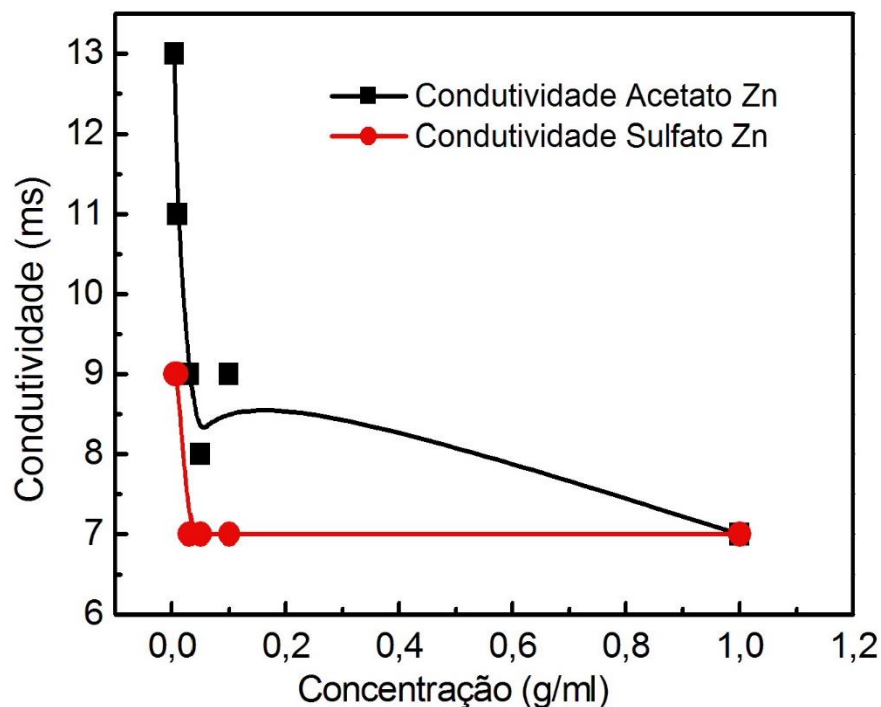


Figura 18: Variação nos valores da Condutividade nas diferentes amostras de Nanoemulsão.

4.6 Viscosidade

A viscosidade é uma característica importante porque determina a facilidade ou dificuldade de escoamento. Em nanoemulsão, quanto maior a viscosidade, maior é a estabilidade e tempo de vida útil da amostra para testes. Os valores da viscosidade variaram com o *EHL* da mistura de tensoativos e pode ser observado um valor mínimo para *EHL* igual a 7,5 [97].

As amostras apresentam a mesma quantidade de tensoativos em um *EHL* requerido de 12, 7%. A variação dos valores de viscosidade está diretamente associada a concentração de Nanopartículas presentes em cada amostra onde, as formulações que apresentam maior quantidade para *ACTZn* e *SULZn* (A 0,1 g, A 1 g, S 0,1 g e S 1 g) expressam o maior valor de viscosidade.

A Figura 19 representa a concentração em função da viscosidade e para concentrações abaixo de 0,05 g/mL é aproximadamente constante para as nanoemulsões *ACTZn* e *SULZn*. Para valores de concentrações maiores que 0,05 g/mL, a viscosidade aumenta.

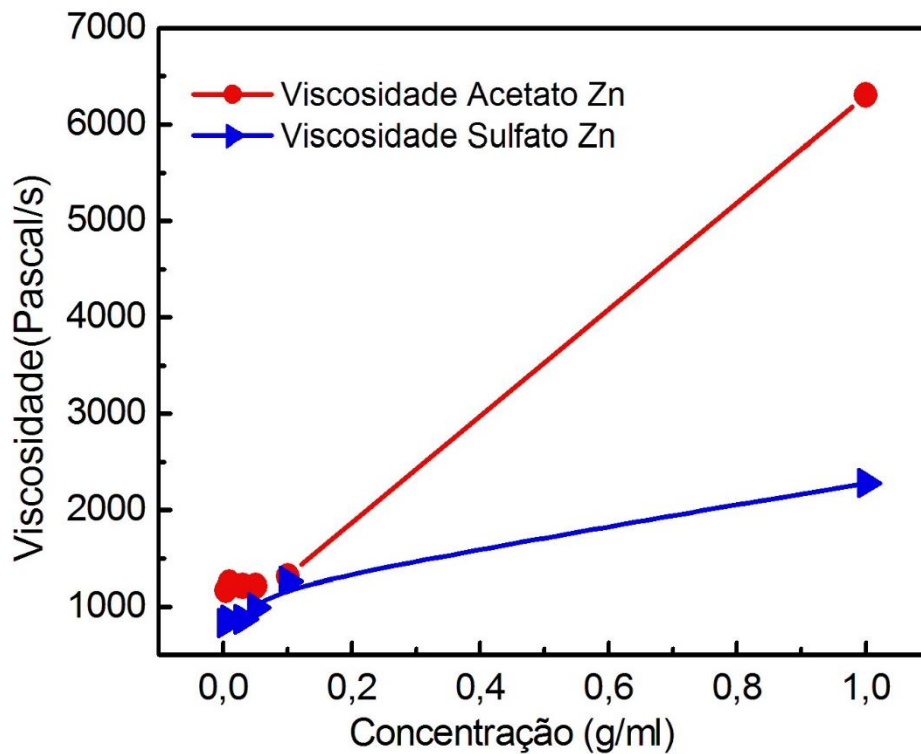


Figura 19: Valor da Viscosidade das amostras de Nanoemulsão.

A Figura 20 mostra o tempo de escoamento para as amostras de *ACTZn* e *SULZn* em que ambas crescem com a concentração. No entanto, a viscosidade aumenta bruscamente para amostra *ACTZn* em relação a *SULZn*. Isto sugere que a nanoemulsão *ACTZn* apresentam um coeficiente de viscosidade compatível com a estabilidade. A Figura 20, mostra a relação entre o tempo de escoamento e a concentração para as amostras *ACTZn* e *SULZn*. É observado que, o tempo de escoamento aumenta consideravelmente para amostra *ACTZn* em relação a *SULZn*. Sugerindo que a nanoemulsão *ACTZn* apresentam um coeficiente de tempo de escoamento maior que a nanoemulsão *SULZn*.

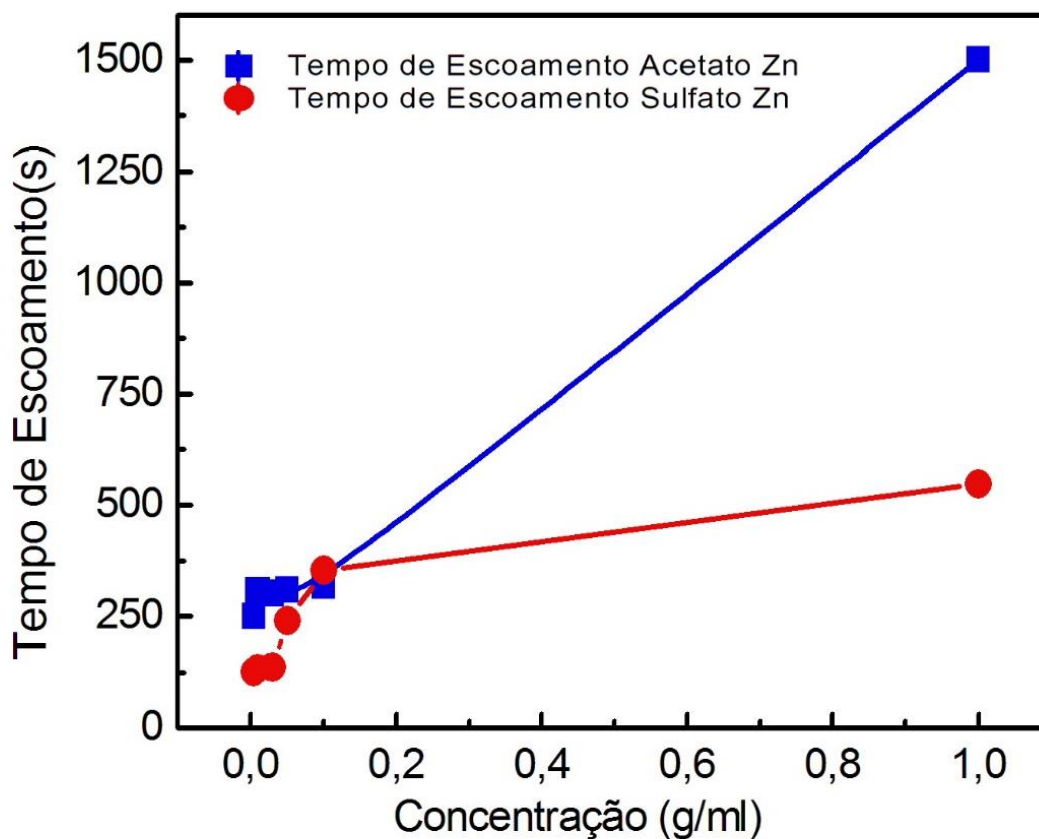


Figura 20: Valor do Tempo de Escoamento das amostras de Nanoemulsões.

4.7 Densidade

A concentração em função da densidade das nanoemulsões, medidas a 25 °C apresentadas (Figura 21) possuem valores próximos do componente majoritário, da água 1,00 g/cm³, resultados compatíveis com a literatura [97]. Em comparação as amostras formuladas com Acetato de Zinco e Sulfato, houve pouca variação nos resultados, porém, as amostras menos concentradas em Nanopartículas com Sulfato de Zinco os valores foram um pouco

inferiores a $1,00 \text{ g/cm}^3$ mantendo característica de estabilidade. Os valores da densidade e a curva dos resultados da amostra de Acetato se apresentam consideravelmente maiores.

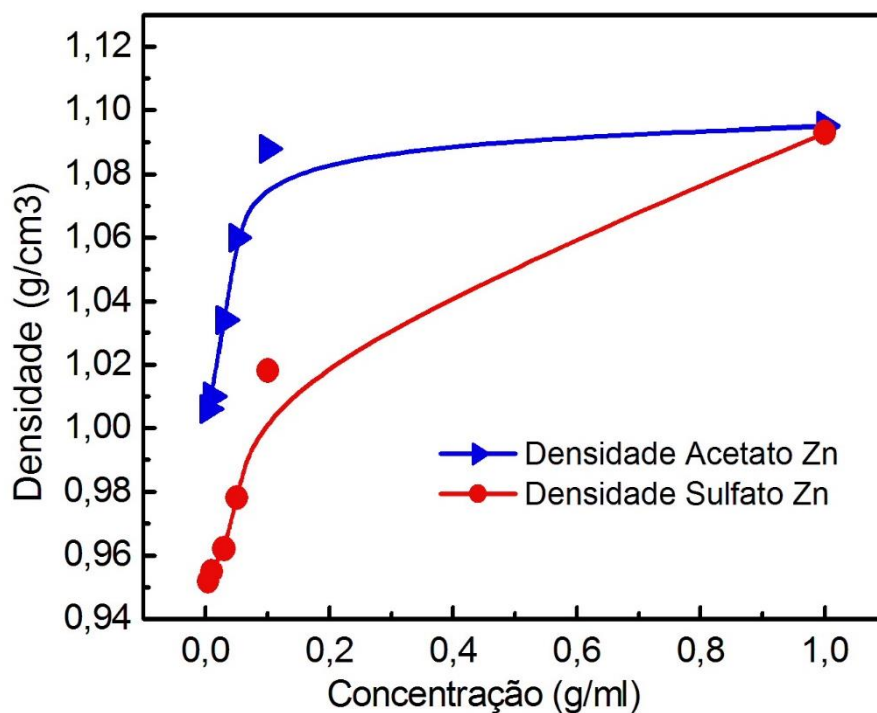


Figura 21: Valor da Densidade obtidas das diferentes formulações.

4.8 Avaliação Macroscópica

A análise macroscópica das amostras contendo Óleo de Copaíba, apresentaram aspecto leitoso, coloração branca para as que são formuladas com baixa concentração de Nanopartículas e coloração parda a acobreada para as amostras formuladas com quantidade maior conforme Figuras 22 e 23.

FORMULAÇÕES COM NANOPARTÍCULAS DE ACETATO

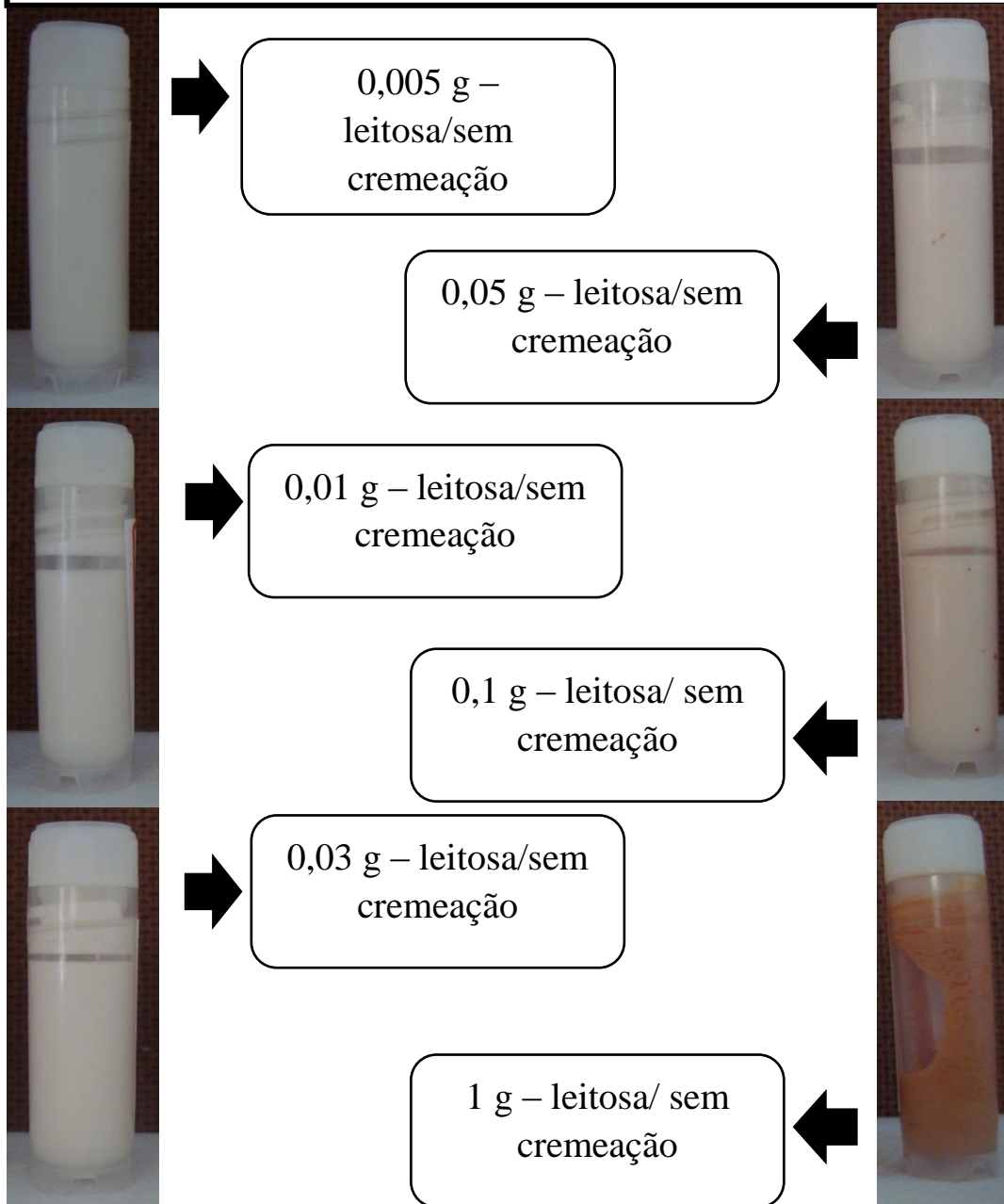


Figura 22: Avaliação macroscópica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Acetato de Zinco.

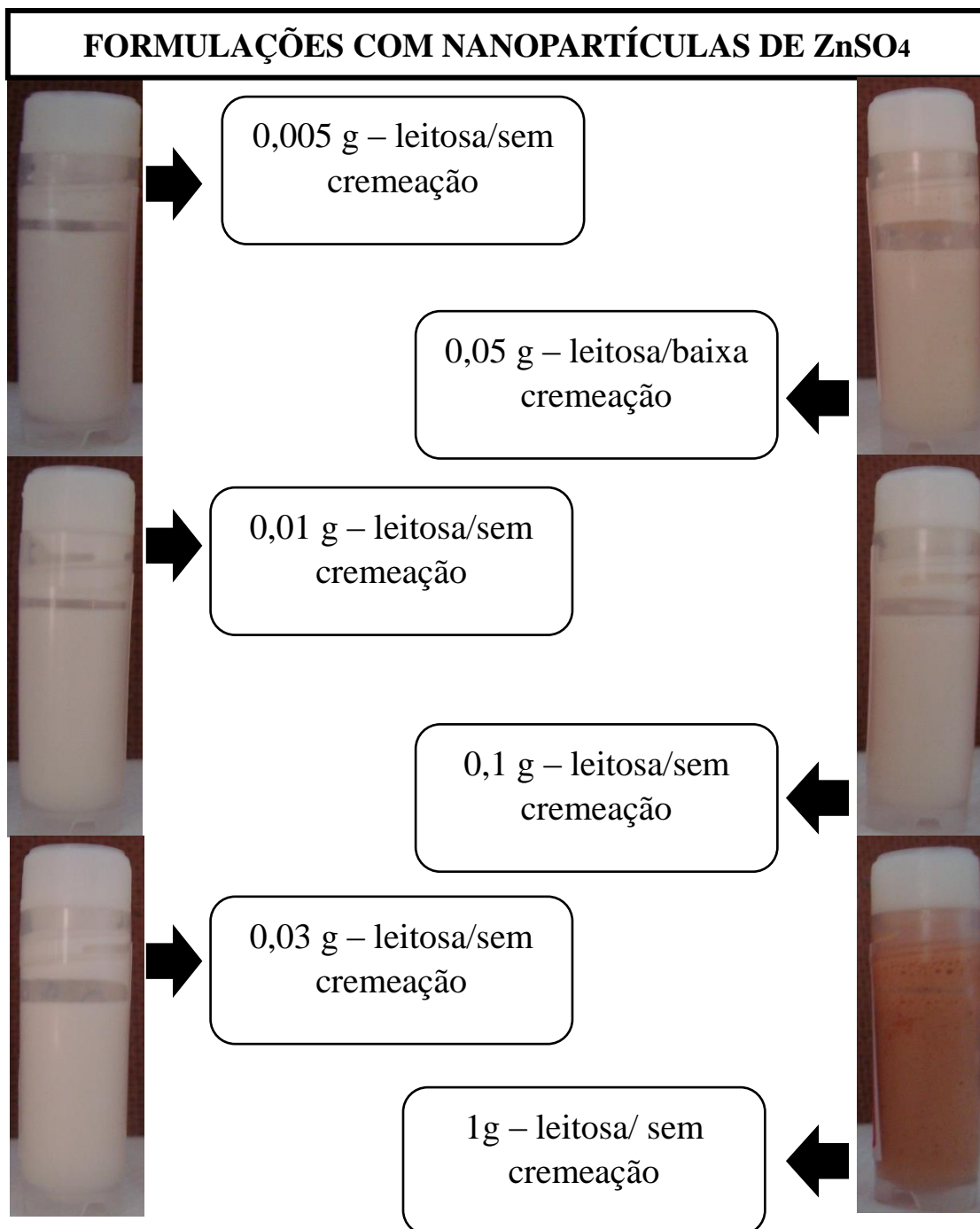


Figura 23: Avaliação macroscópica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Sulfato de Zinco.

4.9 Microscopia Óptica

Com o intuito de observar a homogeneidade das formulações obtidas em diferentes concentrações (Tabela 7), as emulsões foram analisadas em microscópio óptico

Olympus CX31 com aumento de 400X. Para este procedimento, as nanoemulsões foram gotejadas em uma lâmina de vidro e cobertas com lamínulas. As microfotografias foram capturadas com auxílio de uma câmera digital Samsung WB250F (Figura 24).

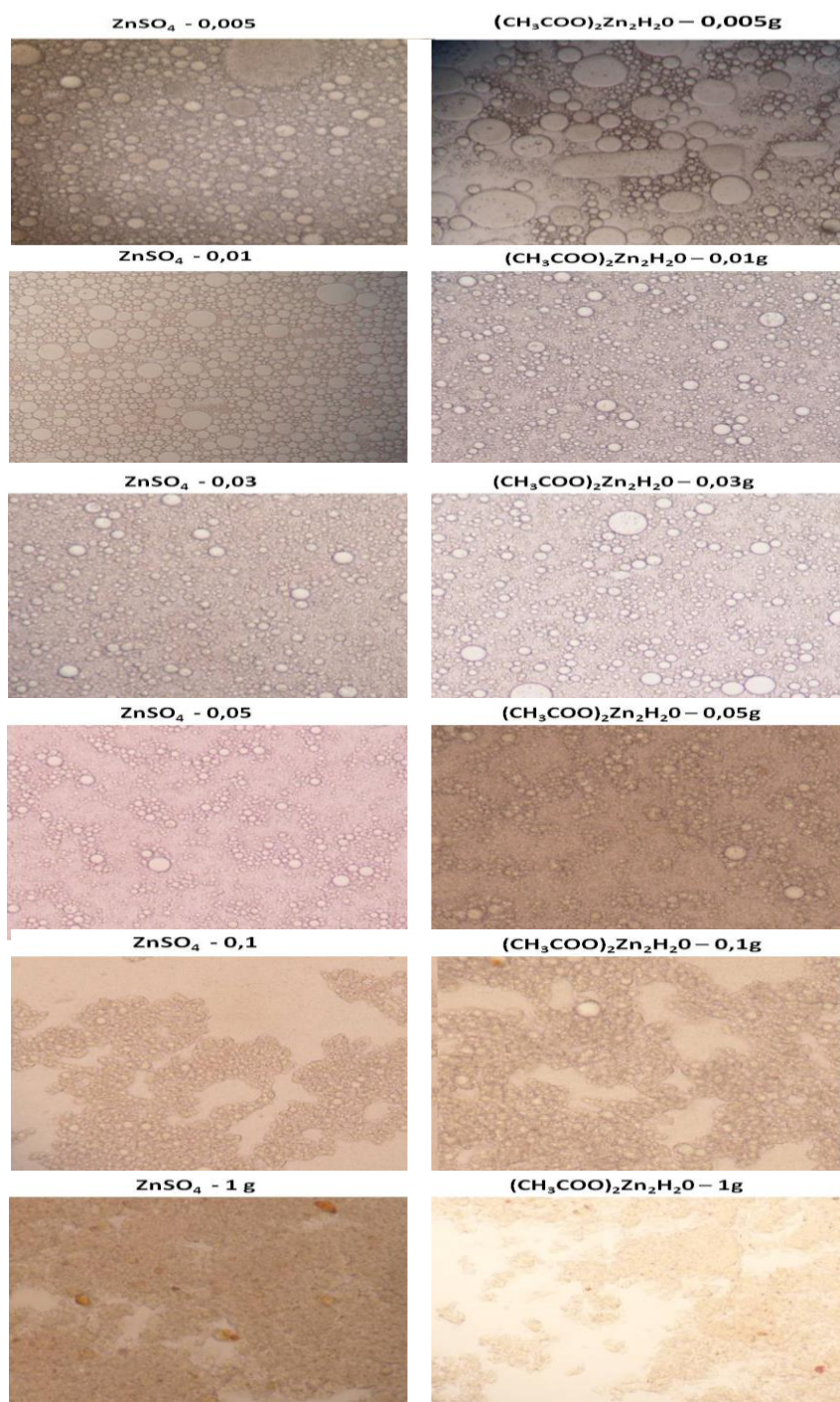


Figura 24: Avaliação por microscopia óptica das diferentes Nanoemulsões formuladas com Acetato e Sulfato de Zinco.

Tabela 7: Avaliação das características Macroscópicas e Microscópicas das diferentes Nanoemulsões formuladas com *ACTZn* e *SULZn*.

FORMULAÇÕES	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
ZnSO ₄ – 0,005g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
ZnSO ₄ – 0,01g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
ZnSO ₄ – 0,03g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
ZnSO ₄ – 0,05g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação
ZnSO ₄ – 0,1g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação Floculação
ZnSO ₄ – 1g	Gel pastoso / viscosidade Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação Floculação
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 0,005g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 0,01g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 0,03g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 0,05g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 0,1g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação Floculação
(CH ₃ COO) ₂ Zn ₂ H ₂ O – 1g	Emulsão fluida / leitosa Não apresentando Cremeação	Glóbulos de tamanhos diversos Apresenta cremeação Floculação
Óleo de Copaíba – 100%	Gel translúcido	Presença de glóbulos – textura fina

4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 25 representa fotomicrografias obtidas por MET do puro Óleo-resina de Copaíba utilizado para desenvolver as nanoemulsões. A imagem A, observa-se as gotículas com ampliação de 25.000 K e em B com a aproximação de 400.000 K, é possível identificar o tamanho variável entre 5 a 15 nanômetros.

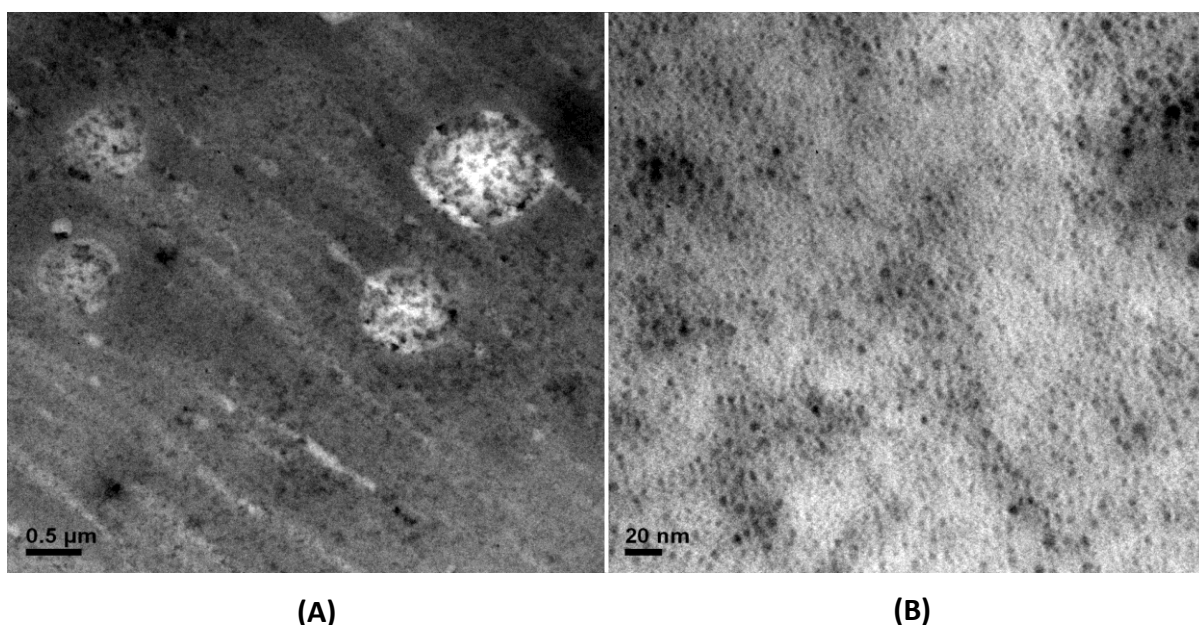


Figura 25: Gotículas do óleo de copaíba. Microfotografias obtidas por MET, com aproximação de 25.000 K (A) e 400.000 K (B).

Na Figura 26 (A e B), foram extraídas Fotomicrografias nas Nanopartículas de *ACTZn* (A) e *SULZn* (B) não funcionalizadas para que fossem feitas as comparações da morfologia e tamanho em escala nanométrica. Nas duas Figuras (A e B), as Nanopartículas

encontram-se aglomeradas, mas, é possível a visualização de uma estrutura relativamente esférica medindo cerca de 20 nanômetros para ambas as amostras.

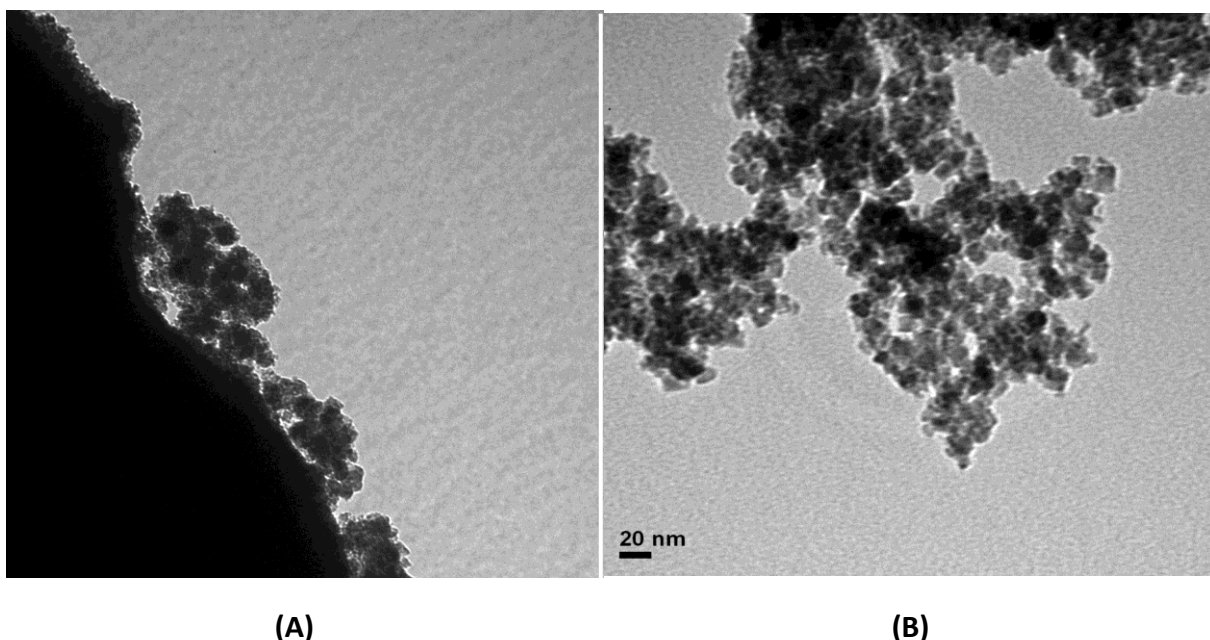


Figura 26: Microfotografias obtidas por *MET* –(A) nanopartículas de Acetato de Zinco; (B) – nanopartículas de Sulfato de Zinco.

Nas imagens obtidas por *MET*, foram detectadas na formulação de ZnSO_4 em concentração de 0.05 g/mL, a presença do modelo amorfo tipo II. São obtidos a partir da mistura de lipídios sólidos que não recristalizam após o processo de homogeneização e arrefecimento da nanoemulsão. Estes lipídios permitem a preparação de partículas sólidas com estrutura amorfa mas não cristalina, minimizando a expulsão do fármaco durante o armazenamento, pois evita a cristalização formando compostos mais estáveis e biocompatíveis [98; 99].

Existem também três modelos que descrevem a incorporação de fármacos (Figura 27) : (i) o modelo do cristal imperfeito (*NLC* do tipo I), (ii) o modelo amorfo (*NLC* do tipo II) e (iii) o modelo múltiplo (*NLC* do tipo III) [98].

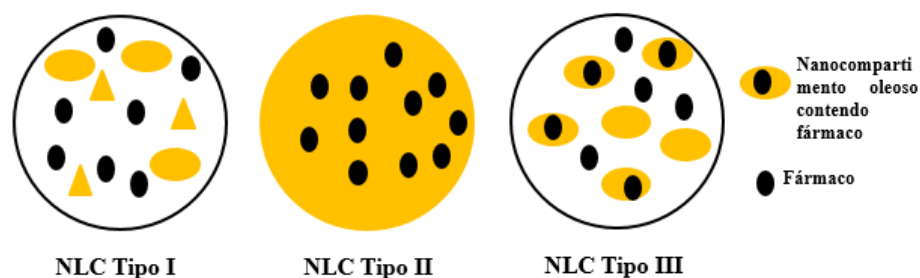


Figura 27: Tipos de Nanoemulsões segundo os modelos de incorporação de fármacos. Adaptado [98].

Na Figura 28, são observados glóbulos da Nanoemulsão de $ZnSO_4$ na concentração de 0,05 g/mL característicos de modelo amorfo e modelo múltiplo. A presença do revestimento lipídico e a estrutura aglomerada de partículas caracteriza a funcionalização das partículas.

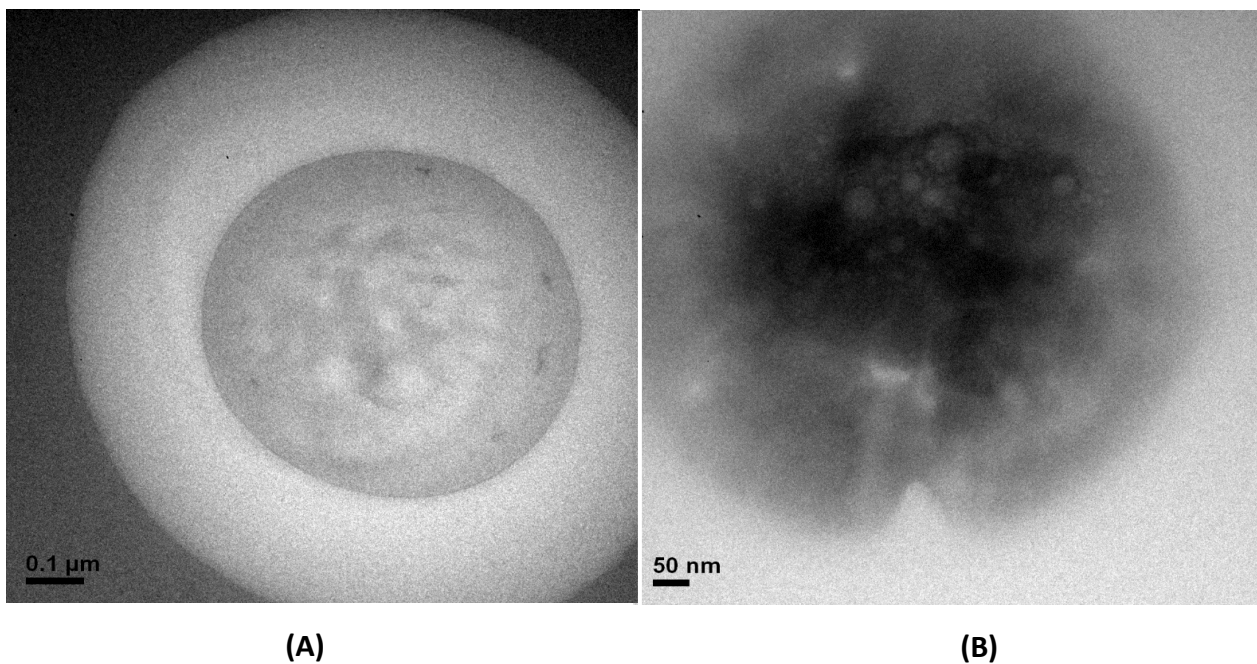


Figura 28: Imagens dos glóbulos de $ZnSO_4$ na concentração de 0,05g. (A) presença de halo lipídico, (B) *NLC*

tipo II. Microfotografias obtidas por MET.

Na Figura 29 são observadas nanopartículas com tamanho variável entre 10 a 15 nanômetros e aglomeradas com formato oval e esférico. A presença das partículas aglomeradas pode ser devido ao modo de preparo para análise em MET em função da diluição. Neste caso, a diluição foi realizada de 1:1000 da amostra original de Nanoemulsão.

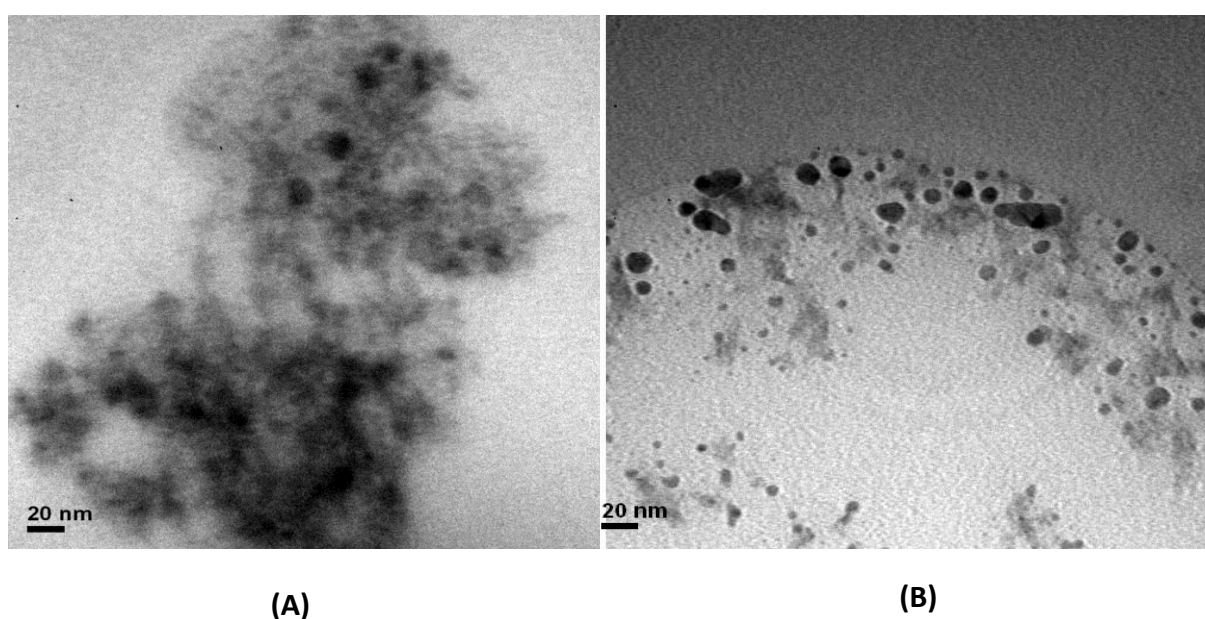


Figura 29: Imagens de nanoemulsão de ZnSO₄ na concentração de 1 g/mL, (A) NP com tamanho inferior a 20 nm, (B) NP com formas esféricas e aglomeradas . Microfotografias obtidas por MET.

Na Figura 30, foram obtidas imagens da Nanoemulsão de Acetato de Zinco na concentração de 0,05 g/mL com Nanopartículas de formatos variados, apresentando-se como esferas, ovais e alongadas e tamanho variando de 20 a 50 nanômetros.

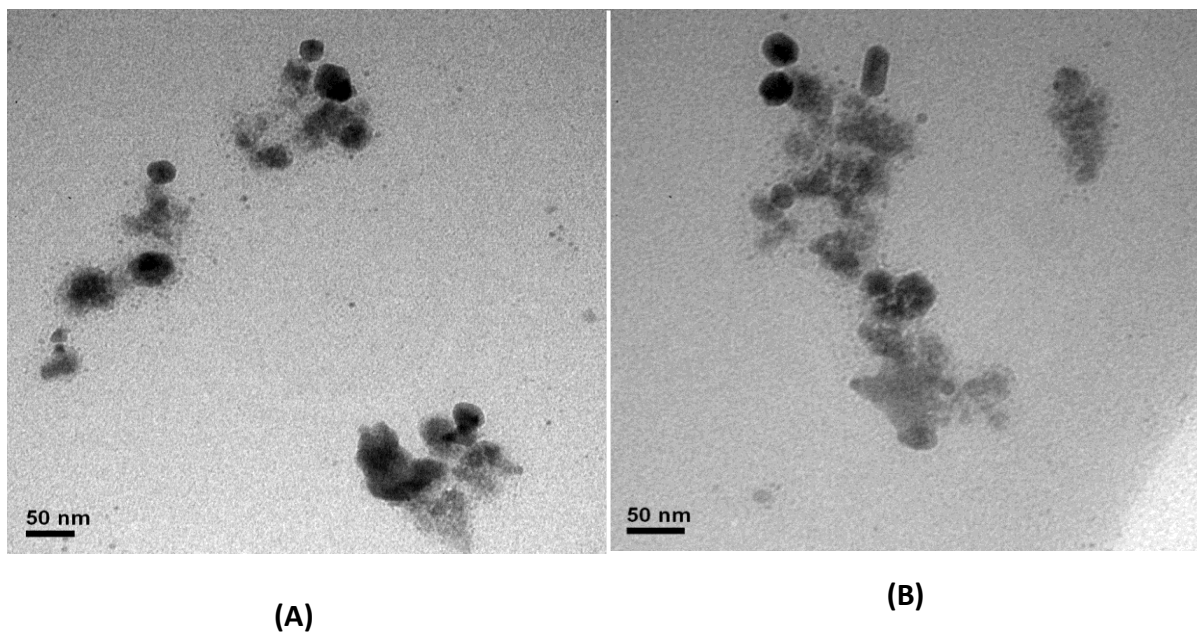


Figura 30: Nanoemulsão de Acetato na concentração de 0,05 g/ml. (A) NP com formas distintas entre esféricas e irregulares, (B) NP com formas esféricas e alongadas. Microfotografias obtidas por MET.

Um outro tipo modelo de incorporação de fármaco encontrado, foi o múltiplo do tipo III (Figura 31) apresentando estrutura esférica com 80 nm. Este modelo é caracterizado por pequenos nanocompartimentos oleosos dentro da matriz lipídica sólida, gerados pela separação de fases. É obtido através da mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos, numa proporção onde se excede a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio

sólido. Após a produção da nanoemulsão a elevadas temperaturas (80 °C), ocorre o arrefecimento e as gotas de lipídio alcançam a miscibilidade (cerca dos 40 °C), precipitando sob a forma de pequenas gotas no lipídio sólido fundido [98].

Um problema encontrado quanto aos tipos de nanocompartimentos de fármacos sintetizados é que com o armazenamento, a estabilidade da dispersão lipídica pode ser comprometida por diversos fenômenos, como a gelificação, em que ocorre o aumento do tamanho das partículas e as modificações lipídicas para estruturas cristalinas mais estáveis que, em última análise, conduzem à expulsão do fármaco do sistema transportador [101; 99].

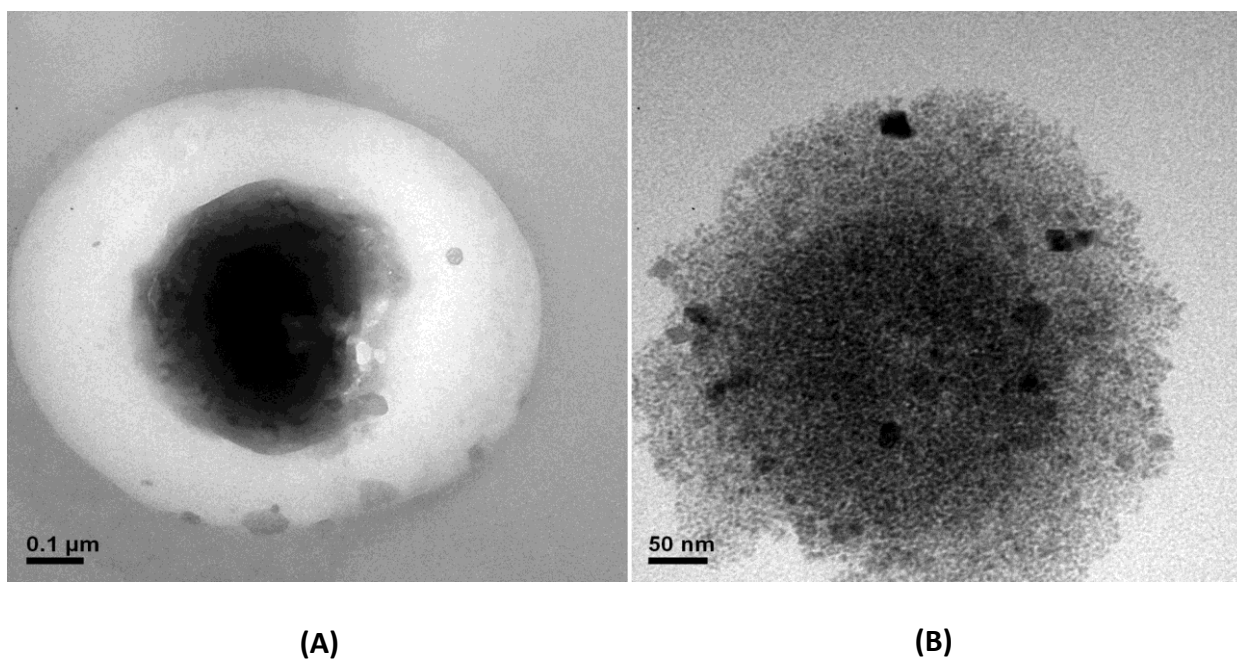


Figura 31: Nanoemulsão de Acetato na concentração de 1g/ml. (A) Presença de halo lipídico e (B) aglomerado de NP. Microfotografias obtidas por MET, com aproximação de 120.000 K.

4.11 Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura 32 apresenta fotomicrografias obtidas por *MEV* das Nanopartículas de Acetato de Zinco e Sulfato de Zinco puras e diluídas de 1:1000 em água destilada. Não foi possível definir o tamanho médio das estruturas já que se apresentam aglomeradas devido ao modo de preparo para análise em *MEV* pois, as amostras são secas à temperatura ambiente, e conforme a evaporação da água, elas tendem a formar aglomerados [102] ou a diluição ser insuficiente para observar as nanopartículas afastadas.

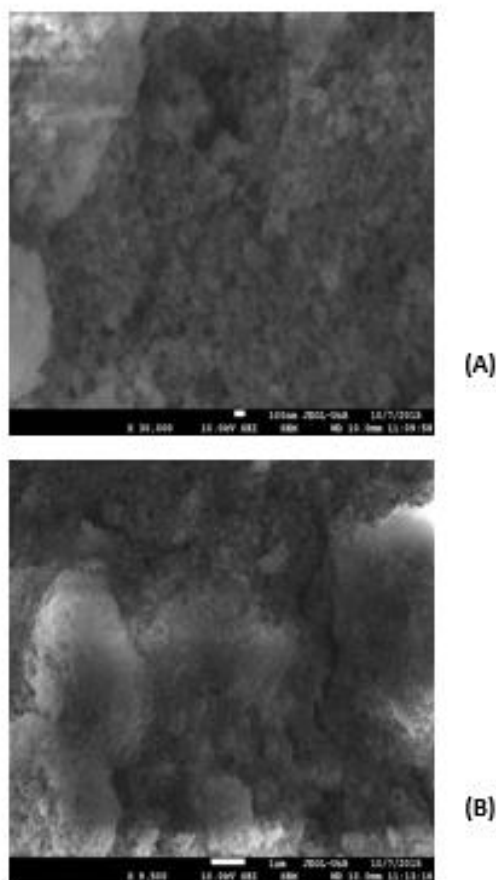


Figura 32: Nanopartículas de *ACTZn* (A) e *SULZn* (B) diluídas de 1:1000. (A) e (B) textura que confirma a composição da amostra por $ZnFe_2O_4$. Microfotografias obtidas por *MEV*.

4.12 Análises em EPR

As análises de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (*RPE*) foram realizadas no laboratório do instituto de Física da universidade de Brasília - UNB, no espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica *BRUKER* modelo *ELEXSYSII E580* com intensidade modulada, operando na banda-X, frequência 9,4 *GHz* e temperatura ambiente.

A simples descrição da ressonância associada a concentração começa com a equação de ressonância $H_{EFF} = \omega_r / \gamma$, entre H_{EFF} e o efeito do campo e o local de ressonância, onde ω_r é a frequência de micro-ondas, γ é a constante giromagnética [104]. O campo efetivo é essencialmente uma combinação do campo externo (H_E) e campo dipolar (H_d). A contribuição dipolar com $1/d^3$ depende da concentração C , onde d é a distância média entre as nanopartículas da nanoemulsão. A Figura 34 mostra que o campo de ressonância segue um comportamento linear com a concentração de partícula na nanoemulsão conforme $H_r = H_o + bC$ onde H_o é o campo de ressonância inicial e tem valores de 3502 G para *ACTZn* e 3335 G para *SULZn*. A razão H_r/C é 131 G para *ACTZn* e 108,5 G para *SULZn* sugerindo que houve um melhor encapsulamento das nanopartículas *ACTZn* em comparação com a *SULZn* na nanoemulsão.

Na Figura 33 é apresentada a largura da linha de ressonância em função da concentração que também apresenta um comportamento linear $\Delta H_r = \Delta H_o + bC$ corroborando os resultados da Figura 34 para as amostras *ACTZn* e *SULZn*.

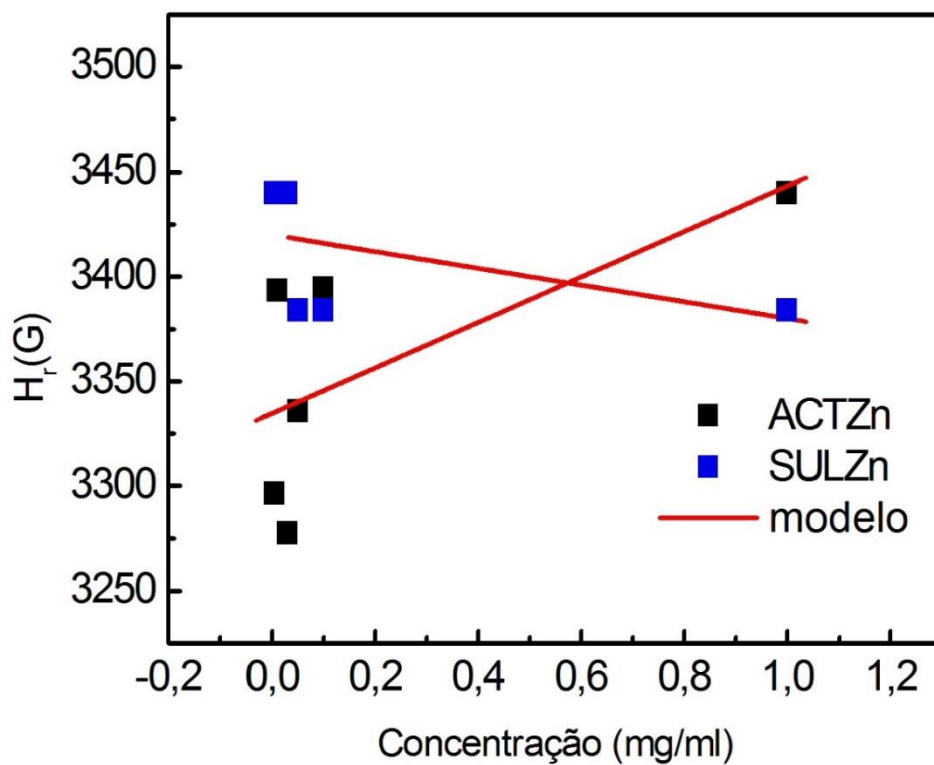


Figura 33: Relação entre campo e modelo das amostras de Acetato e Sulfato de Zinco.

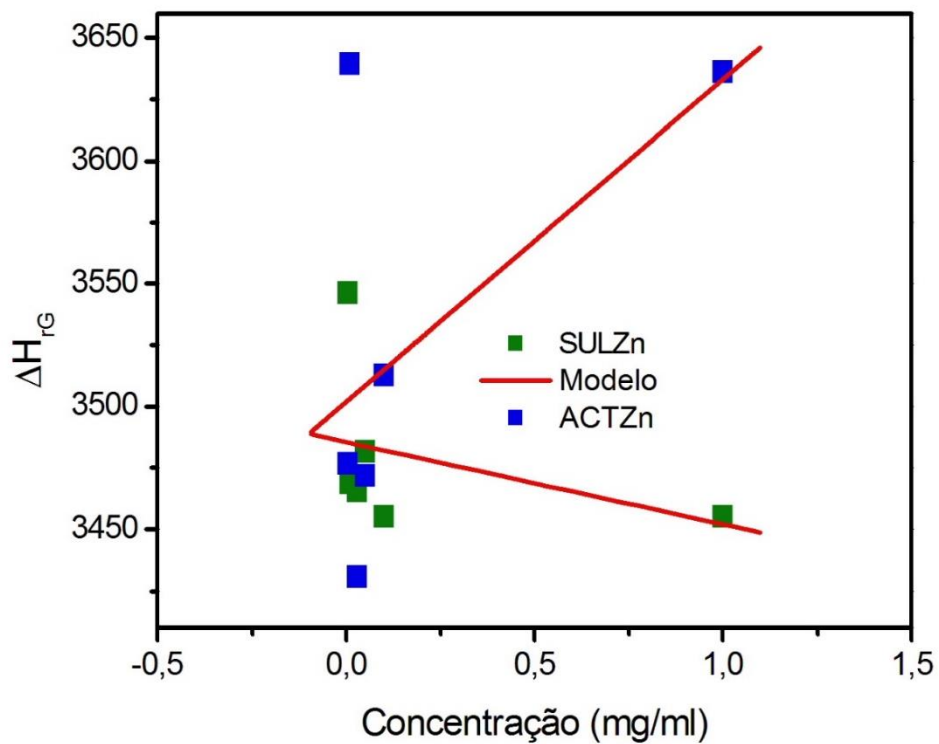


Figura 34: Valor do tempo de escoamento das amostras de Nanoemulsão.

CAPITULO 5 – CONCLUSÕES

Neste capítulo apresentamos as conclusões deste trabalho de mestrado através da síntese e caracterização das amostras de nanoemulsões *ACTZn* e *SULZn*. A síntese foi realizada pelo método de coprecipitação e a caracterização física das amostras foram feitas a medida de Centrifugação e Estresse Térmico, medidas de Potencial Zeta-sizer, *pH* e variações após Estresse Térmico, medidas de Condutividade, medidas de Viscosidade, medidas de Densidade, Análises Macroscópicas, Análises em Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura e medidas de *EPR* usando o princípio da ressonância ferromagnética.

Da Síntese

A partir do desenvolvimento das nanoemulsões foi possível concluir que:

- A associação dos tensoativos hidrofílico e lipofílico escolhidos tornou a nanoemulsão estável.
- É possível a obtenção de nanoemulsões associadas a partículas magnéticas com tamanho entre 20 nm a 100 nm.
- As nanoemulsões desestabilizaram com o aumento da concentração de nanopartículas e se mantiveram estáveis em concentrações menores entre 0,005 mg/mL e 0,03 mg/mL para as amostras *ACTZn* e *SULZn*.

- A velocidade de 980 rpm foi a mais eficaz pois as amostras mantiveram estabilidade.
- A concentração de tensoativos total em 12,7% foi suficiente para a obtenção de nanoemulsões estáveis.
- As formulações que apresentaram cremeação e separação de fases foram aquelas onde a concentração de nanopartículas foi maior.
- Avaliação macroscópica das duas Nanoemulsões apresentaram coloração branca a cobre com o aumento da concentração.

Da Caracterização

Medidas de *pH*

- As medidas de *pH* para as amostras *ACTZn* (3,2-6,2) e *SULZn* (3,0-5,2) apresentaram mesmo comportamento do tipo Boltzmann, com aumento do *pH* após as amostras sofrerem envelhecimento de 90 dias e redução do *pH* após o estresse térmico.

Medidas de Condutividade Elétrica

- As medidas de condutividade para as amostras *ACTZn* (7-13) e *SULZn* (7-9) apresentaram mesmo comportamento do tipo decaimento exponencial de 1ª ordem acentuado para concentrações de nanopartículas entre 0,005 a 0,03 mg/mL. A

amostra de *ACTZn* apresentou índice de viscosidade maior que a amostras de *SULZn*. Isto sugere um maior estabilidade na nanoemulsão de *ACTZn*.

Medidas de Viscosidade

- As medidas de viscosidade para as amostras *ACTZn* (980-2100 Pa/s) e *SULZn* (985-6100 Pa/s) apresentando aumento da viscosidade com a concentração de nanopartículas na nanoemulsão. O resultado representa uma maior estabilidade na nanoemulsão de *ACTZn*.

Tempo de Escoamento

- É observado que, o tempo de escoamento aumenta consideravelmente para amostra *ACTZn* em relação a *SULZn*. Sugerindo que a nanoemulsão *ACTZn* apresentam um coeficiente de tempo de escoamento maior que a nanoemulsão *SULZn* e desta forma propriedades de estabilidades.

Medidas de Densidade

- A densidade das nanoemulsões aumenta com a concentração. A densidade é maior a amostra *ACTZn* em relação a *SULZn*.

Medidas de Potencial Zeta Sizer

- As medidas de potencial-zeta mostram que a nanoemulsão *ACTZn* e decrescimento do diâmetro sugerindo que há uma redução do diâmetro e conseqüentemente na densidade de carga na superfície da nanogota.
- Para a nanoemulsão *SULZn* houve uma flutuação no diâmetro e na densidade de carga da superfície da nanogota com a concentração.

Medidas de Microscopia Óptica

- Apresentaram floculação em todas as concentrações com nanogotas complexadas por supergotas da nanoemulsão.

Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão

- Mostrou que há o óleo de copaíba puro apresenta centros de ácidos diterpênicos e sesquiterpênicos em forma de nanogotas.
- As nanopartículas de *ACTZn* e *SULZn* tem formas distintas entre esféricas e cilíndricas.
- As nanoemulsões de ambas as amostras foram funcionalizadas e apresentam em super glóbulos os nanoglóbulos contendo nanopartículas de ferritas de zinco.

Microscopia Eletrônica de Varredura

- As microfotografias de mostraram uma textura similar para ambas amostras mostrando a forte presença do zinco na estrutura da ferrita.

Ressonância Paramagnética Eletrônica-*EPR*

- Medidas de *EPR* mostraram que a interação dipolar é crescente na amostra de nanoemulsão *ACTZn* e decrescente na amostra de nanoemulsão de *SULZn*.
Mostrando que houve uma melhor incorporação da nanopartículas na nanoemulsão *ACTZn* conseqüentemente maior estabilidade.

CAPITULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T.; **Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. Journal of Bioscience and Bioengineering**, 100 (1): 1-11, 2005.
- [2] CAMARGO, M. F.P., **Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica**, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008,
- [3] ALVES, M. P.; **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de minesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.
- [4] FERNANDEZ, P., ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A.; **Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.
- [5] SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B.W.; **Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair. Sorbitano monolaurate/ polyoxyethylene**

sorbitano monolaurate (Span 20/tween 20). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 252, p.27-32, 2003.

[6] SOLANS, C. **Nanoemulsions.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, n. 10, p. 102-110, 2005.

[7] TADROS, T. F.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. **Formation and Stability of nanoemulsion.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

[8] TLUSTEY, T.; SAFRAN, S.A., **Condens Matter** 12. *Journal Physics*, 2000.

[9] MASON, T.G.; WILKING, J.N.; MELENSON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, SM. **Nanoemulsions: formation, structure, and physical proprieties.** *Journal os Physics: Condesnsed Matter*, v.18, 2006.

[10] PAIVA, L.A.F, GURGEL, L.A., SOUSA, E.T., SILVEIRA, E.R., SILVA, R.M., SANTOS, F.A., **Protective effect os Copaifera langsdorfii óleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats.** *Journal Ethnopharmacolgy*, v.93, 2004.

[11] GOMES, N. M, DE REZENDE CM, FONTES SP, MATHEUS ME, PINTO AC, FERNANDES PD. **Characterization of the antinociceptive and antiinflammatory activities of fractions obtained from Copaifera multijuga H.a-yne.** *Journal Ethnopharmacology* 2010.

- [12] MOURA, W.R.A.; **Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatórias, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, Harm e Sida santaremnensis**, Monteiro. Pós Graduação em Ciência Animal (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Piauí, 2010.
- [13] RUSSE, W.B.; SARVILLE D.A.; SCHOWALTER W.R.; **Coloidal dispersions**. Cambridge University UK, 1989.
- [14] FORGIARINI, A., ESQUENA, J. GONZALEZ, C; SOLANS , C. **Formations of nanoemulsions by low – energy emulsification methods at constant temperature**. Langmuir, v.17, p 2076, 2001.
- [15] MEYAGUSKU, V.M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo Ciprofloxacino**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara-SP, 2014.
- [16] CAPEK, I., **Degration os Kinetically-stable o/w emulsions**, Advances in Colloid Interfacial Science, Amsterdam, v. 107, p. 125-55,2004.
- [17] WONG, H.L.; BRENDAYAN, R.; RAUTH, AM.; LI, Y.; WU, X.Y. **Chemotherapy with anticâncer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles**. Advanced drung delivery reviews, v.59, 2007.

- [18] FERREIRA, T. V.C., **Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Concepção de Novas Arquiteturas contendo nanopartículas: preparação, caracterização e Desempenho para Eletrocatalise e Biosensores**. Tese de Doutorado (Doutorado em Química). Universidade de Lisboa, 2011.
- [19] MASON, T. G.; WILKING, J. N.; ELEMSON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. **Nanoemulsions formation, structure and physical properties**. Journal of Physics: Condensed Matter, v. 18, p. 635, 2006.
- [20] TADROS, T., IZQUIERDO, P, ESQUENA, J, SOLANS, C. **Formations and stability of nanoemulsions**. Advances in Colloid Interface Science 108-109: 303-318, 2004
- [21] BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- [22] TADROS, T., KESSELL, L. **Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications**, Cosmetics and Toiletries, n. 119, p.41-46, 2004.
- [23] DALVIN, D. **Tensoativos – Química, Propriedades e Aplicações**. Editora Blucher, São Paulo, 2011.
- [24] SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J.T., L'ALLORET, F. **Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products**. Journal of Physics: Condensed Matter, 2004.

- [25] MASON, t. g.; WILKIMH, J.N.; MELENSON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. **Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties.** Journal os Physics: Condensed Matter, v.18, p. 635, 2006.
- [26] IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. **The influence of surfactante mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method,** Journal of Colloid and Interface Science. New York, v. 285, p. 388-394, 2005.
- [27] RADTKE, H.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. **Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers.** Pharmaceutical technology europe, v.17, p. 4045, 2005.
- [28] SANTOS, J. S. **Nanopartículas – Aplicações cosméticas e farmacêuticas.** Pharmabooks editora, 139 p., 2010.
- [29] SCHAFFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. **Lipid nanoparticles for improved tropical application of drugs for skin diseases.** Advanced drug deluvery reviews, v. 59, p. 427-443, 2007.
- [30] SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L, POHLMANN, A.R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, v.26, p. 726 – 737, 2003.

- [31] GARCIA, T.B.; SOLSONA, A.T. **Naphthalene total oxidation over metal oxide catalysts.** Applied Catalysis B-Environmental, v. 66, 2006.
- [32] MOHAMMED SULEIMAN, M.M AMJAD HUSSEIN, HAMMAOUTI, T., HADDA, T.B., **Copper (II)-Oxide Nanostructures: synthesis, characterizations and their Applications.** Review. Journal os Materials and Environmental Science. V.4, 2013.
- [33] L.S. CRUZ, C.R. SCIENA, D.S. CORREA, E.C. PARIS. **Síntese por Coprecipitação de Nanopartículas de Hidroxiapatita e Óxido Cúprico para aplicação no agronegócio.**
- [34] AUZANS, E. **Mn-Zn ferrite nanoparticles for water- and hydrocarbone-based ferrofluids: preparation and properties.**, 1999.
- [35] BRANCO, R. M., **Nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação homogênea sonoquimicamente assistida.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Alfenas, 2013.
- [36] BECHER, P. **Emulsions; theory and practice.** 3rd. Ed. New York: Oxford University Press, 2001.
- [37] (LUI, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. **Formation and stability of parafin oil-in-water nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method.** Journal os Colloid and Interface Science, v. 303, p. 557-563, 2005;

- [38] MORALES, D.; GUIERRREZ, J.M.; GRACIA-CELMA, M.J.; SOLANS, Y.C. **A study o the relation between biocontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation.** Langmuir, v.19, p.. 7196-7200, 2003.
- [39] SOUZA, C.R.F.; GEORGETTI, R.; SALVADOR, M.J. FONSECA, M.I.V.; OLIVEIRA, W.P. **Antioxidant activity and physical proprieties of spray an spouted bed dried extracts of Bauhinia forticata.** Brazilian Journal os Pharmaceutical Science, v. 45, 2009.
- [40] Oliveira, M. C. K. - "**Remediação de solos contaminados por compostos orgânicos utilizando-se microemulsão**", Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil 2003.
- [41] GRIFFIM, W.C. **Classification os Surface-active agentes by HBL.** J. os Society os Cosmetic Chemists, n. 1, p. 311,1954.
- [42] BOUCEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRIER, E.; FESSI, H. **Nanoemulsion formnnulation using spontaneous emulsification: solvente, oil and surfactant optimization.** Ingternation Journal of Pharmaceutics, New York, v. 280, 2004.
- [43] MORRISIN, I. D; ROSS, S. **Emulsions. Colloid dispersions- suspensions Emulsions and Foams,** Nem York: Jhon Eilley Sons, 2002.

[44] CAMARGO, M.F.P., **Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica.** Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

[45] CORREA, R.F.; **Efeitos antimicrobianos, antiácidos e removedores de biofilmes de algumas espécies vegetais da Amazônia sobre *Streptococcus Mutans*.** (Dissertação de Mestrado) Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 2007.

[46] SILVA, I.C.M.; **Fracionamento de óleo de *Copaifera Multijulga Hayne* pelo uso do CO₂ pressurizado.** 2004. (Dissertação de Mestrado) Engenharia Química, Universidade Federal do Pará, 2004.

[47] VEIGA JUNIOR, V.F. **Plantas medicinais: cura segura?** Química nova, v.28, n.3, p.519., 2005.

[48] DWYER, J. D.; **The Central American, West Indian, and South American species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae).** *Brittonia* 1951, 7, 143.

[49] LIMA A. F.; LIMA, J.F.G.F. **UTILIZAÇÃO MEDICINAL DO ÓLEO DE COPAÍBA: aspectos históricos e estudos atuais.** 2012. Disponível em: <http://blog.newtonpaiva.br/pos/e5s46-utilizacao-medicinal-do-oleo-de-copaiba-aspectos-historicos-e-estudos-atuais/>. Acesso em: 26 de Outubro, 2015.

[50] LIMA A. F.; LIMA, J.F.G.F. **Utilização medicinal do óleo de copaíba: aspectos históricos e estudos atuais.** 2012. Disponível em: <http://blog.newtonpaiva.br/pos/e5s46-utilizacao-medicinal-do-oleo-de-copaiba-aspectos-historicos-e-estudos-atuais/>. Acesso em: 26 de Outubro, 2015.

[51] BARRETO J. R.. A.G., VEIGA JUNIOR, V.F., MACIEL, M.A.M., **Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multifuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*).** Química Nova, v. 28, 200.

[52] DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. **Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.13, p.1-7, 2011.

[53] CASCON, V. **Copaíba: *Copaifera spp.***.In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão Preto, São Paulo, 2004.

[54] MING, C.; GAUDÊNCIO, P.; SANTOS, V. **Plantas Mediciniais. Uso Popular na Reserva Extrativista "Chico Mendes" -Acre.** Botucatu: UNESP/CEPLAM, 1997.

[55] PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. **Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais.** Revista Brasileira de plantas mediciniais, vol.11 no.4, Botucatu, 2009.

- [56] LLOYD, J.U. *Copaifera officinalis*. Chicago: The Western Druggist, 13p. 1898.
- [57] CASCON, V. **Copaíba - *Copaifera spp.*** In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
- [58] RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.** 2006. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2006.
- [59] CASCON, V.; GILBERT, B. **Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga Hayne*.** *Phytochemistry*, v.55, n.7, p.773-8, 2000.
- [60] RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.** 2006. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- [61] OLIVEIRA, E.C.P. **Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju-PA.** *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

- [62] BRITO, N.M.B. **Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v.22, n.8, p.489-93, 2000.
- [63] MACIEL, M.A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, v.25, n.3, p.429-38, 2002.
- [64] MORAES, S.P.; CHAVES, F.R; BANCI, S.; ROVES, P.A.; GEORGETTI, F.; NETO, J.A.R.; **Zinco e Cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos.** Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, vol. 27, 392p., 2000.
- [65] ESTRELA, C. **Tratamento endodôntico radical dos dentes portadores de lesão traumática.** In: Ciência endodôntica; 1ª edição; Artes Medicas, v.2, 2004.
- [66] AGREN, M. S. **Zinc in Wound Repair.** Arch Dermatology. 135p.1999.
- [67] CORDAIN, L. **Implications for the role of diet in acne.** Semin Cutan. Med. Surg. Vol. 24, p. 84-91, 2005.
- [68]. AL-GURAIRI FT, AL-WAIZ M, SHARQUIE KE. **Oral zinc sulphate in the treatment of recalcitrant viral warts: randomized placebo-controlled clinical trial.** Dermatology;146p., 2002.
- [69] SAMPAIO, A.P. S; CASTRO, M. R.; RIVITTI, A. E. **Dermatologia Básica.** 2. Ed., São Paulo: Artes Medica, 1981.

[70] ALMEIDA, C. A. A. **suplementação com zinco reduz os níveis teciduais de citocinas inflamatórias em quadros diarreicos**, Dissertação (Ciências Médicas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

[71] BATISTUZZO, J. A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y;. **Formulário médico-farmacêutico**. 3. ed. São Paulo: Pharma books, 2006. Disponível em: <http://www.google.co50qamZL0lhG5tA&bvm=bvY2I>. Acesso em: 26 de out. 2015.

[72] MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica**. Química Nova, v. 24, p. 87-93, 2001.

[73] ROSSI, C.G.F.T., DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.P. **Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial**. Revista Universitária Rural. Seropédica, RJ, EDUR, vol. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2005.

[74] DALTIM, D. **Tensoativos – química, propriedades e aplicações**. Blucher, São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&s>. Acesso m: 26 de outubro, 2015.

[75] KOURNIATIS, L.R.; SPINELLI, L.S.; MANSUR, C.R.E.; Nanoemulsão óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão, Química Nova, Vol. 33, Nº 2, 2010.

[76] BENITA, S.; LEVY, M.Y. **Submicron emulsions as colloidal drug for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization**, J. of Pharmaceutical Science, 82, 1993.

[77] BRUXEL, F., LAUX, M., WILD, L.B.; FRAGA, M., KOESTER, L.S., TEIXEIRA, H.F., **Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos**. Química Nova, Vol. 35, No. 9, 1827-1840, 2012.

[78] MERG, J.C. **Aproveitamento do glicerol para a produção de glicerol oleado utilizando catalisadores heterogêneos em sistema livre de solvente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2010.

[79] YANG, K.; PENG, H.; WEN, Y.; LI, N.; **Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles**. Applied Surface Science, 256, 3093-3097, 2010.

[80] QU, J.; LIU, G.; WANG, Y.; HONG, R.; **Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia**. Advanced Powder Technology, 21, 461-467, 2010.

[81] MARUNO, M., **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. (Dissertação de Mestrado) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

[82] SANTOS, O. H. D. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de calêndula officinalis com cristais líquidos.** Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

[83] XAVIER JUNIOR, F.H., **Emulsões de óleo de copaíba: determinação do equilíbrio Lipofílico hidrofílico crítico, propriedades e estabilidade físico-químicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

[84] FLORENCE A. R.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

[85] MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques.** New York: CRC, 2012.

[86] PEREIRA, G.G. **Obtenção de nanoemulsões O/A a base de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

[87] ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. **Systematic characterization of oil-water emulsions for formulation design.** International Journal of Pharmaceutics, v. 263, p. 85, 2003.

- [88] ALMEIDA, L.F., BAHIA, M.F. **Reologia: interesse aplicações na área de cosmético-farmacêutica.** *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Port.), v.15, 2003.
- [89] FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba.** 1998. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1998.
- [90] FREITAS, C., MULLER, R.H. **Effect to light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions.** *International Journal of Pharmacy*, v. 168, p. 221-229, 1998.
- [91] MEYAGUSKU, V. M., **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo Ciprofloxacino.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara-SP, 2014.
- [92] MARTINI, E.; **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química.** 2005, Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Produtos Farmacêuticos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- [93] MASMOUDI, H. **The evolution of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method.** In *Journal of Pharmacy*, n.289, 2005.

- [94] LEONARDI, G.S.; GASPAR, R.S.; CAMPOS, P.M.M. **Estudo da variação do *pH* da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva.** Anais brasileiro de Dermatologia, Rio de Janeiro, v.77, p. 563-569, 2002.
- [95] RODRIGUEZ, L.; GONZALEZ, C.; FLORES, L.; JIMENEZ-ZAMUDIO, L.; GRANIEL, J.; ORTIZ, R. **Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology., v.12, p.502-507,2005.
- [96] ANVISA. **Guia para avaliação de segurança dos produtos cosméticos.** Brasília: ANVISA, 2003.
- [97] SILVA JÚNIOR; ZANON JUNIOR, G.B.; ZANELLA, I., RAFFIN, R., CILEO, V., ROSSATO, J., BULHOES, L.O.S. **Formação de nanoemulsão do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã.** Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria. V. 14, 2013.
- [98] SINGHAL, G.B., **Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: as novel solid lipid based drug carrier.** International Research Journal of Pharmacy, p. 40-52. 2011.

- [99] MENDES, A.I.S.; **Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol** , (Dissertação de mestrado) Ciências da Saúde. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Dour. Vila Real, 2013.
- [100] SOUTO, E.B.; ALMEIDA, A.J.; LLER, R.H. **Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects.** Journal os Biomedical Nanotechnology, v.3, n.4, p. 317-331, 2007.
- [101] MEHNERT, W., MADER, K. **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** Advanced Drug Delivery. V.47, 2001.
- [102] FEENANDEZ. P. AMDRÉ, V.; RIEGER, J. KUHMLE, A. **Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** Amsterdam, v.251, 2004.
- [103] PAESE, K., **Desenvolvimento tecnológico , estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsula poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos.** 2008. 185p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2008.
- [104] MORAIS, P.C.; ALONSO, A.; SILVA, O.; BUSKE, N.; **Electron paramagnetic ressonasse os nitroxidedoped magnetic ferrits.** Journal of magntetism and magnetic materials. Elsevier Science, 2002.

