



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS – CCBSA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE SÍNTESE E VETORIZAÇÃO DE MOLÉCULAS – LSVM

NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DO CARVACROL

ALINE ARAÚJO TAVARES

JOÃO PESSOA - PB

2022

ALINE ARAÚJO TAVARES

NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DO CARVACROL

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado à Coordenação de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Eleamen Oliveira

JOÃO PESSOA - PB

2022

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

T231n Tavares, Aline Araújo.
Novos sistemas de liberação do carvacrol [manuscrito] /
Aline Araújo Tavares. - 2022.
33 p.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2022.
"Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira ,
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Nanoemulsão . 2. Monoterpeno. 3. Bioativos. 4.
Sistemas de liberação . I. Título

21. ed. CDD 615.1

ALINE ARAÚJO TAVARES

NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DO CARVACROL

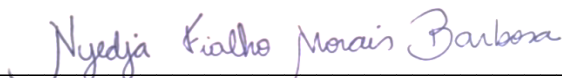
Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado à Coordenação de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas

Aprovada em: 02/12/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira
(ORIENTADOR)



Profª. Me. Nyedja Fialho Morais Barbosa
(MEMBRO INTERNO)



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
(MEMBRO INTERNO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me iluminado todos esses anos, me dando forças e sabedoria para todos os desafios vencidos.

Agradeço à minha família, a meus pais, Severina Araújo e Sebastião por todo investimento, dedicação, amor, carinho e paciência.

À minha irmã Anna Carolina, minha companheira e parceira de todas as horas.

Agradeço também à minha eterna avó Maria das Dores e Dona Nenê por todas as orações e torcida para chegar até aqui.

Ao meu tio, Edinaldo Araújo, que mesmo eu não estando em todos os momentos de família, sempre esteve ali para me incentivar e ajudar no que fosse preciso.

Aos professores, em especial meu orientador, Prof. Elquio Eleamen Oliveira, pela orientação, ensinamentos, confiança e conversas. Sou extremamente grata por todo o incentivo.

Aos meus amigos que me ajudaram a chegar até aqui, em especial Rafael e Isabele que foram os principais para a execução deste trabalho; e às minhas amigas, Thamires e Izabele que esteve sempre ao meu lado para compartilhar os momentos bons e ruins.

A todos os colegas do LSVM-UEPB, pela parceria durante a Graduação.

A meus amigos sem exceções que acompanham essa minha jornada há anos.

Agradeço também a minha segunda família de fé do São Thomaz de Aquino que me traz bálsamos de força em forma de palavras.

E por último, e não menos importante, a minha filha, meu amor maior, minha maior motivação para ser e fazer o melhor por nós duas. Obrigada por ser luz e dar sentido a minha vida. Amo você! E todos, que me ajudaram para a realização desse sonho que é me formar no que eu tanto sonhei, meu muito obrigada.

RESUMO

O uso de bioativos derivados de metabolismo secundário dos vegetais tem se tornado viável para diversos fins, sendo assim, neste trabalho utilizamos o óleo de Carvacrol (CV), o CV é um monoterpene fenólico com atividade comprovada em literatura. Porém, características como a sua hidrofobia, facilidade de oxidação, instabilidade na presença de luz, calor e umidade, podem limitar sua aplicação. Diante a estes problemas, surge como forma de aumentar a estabilidade do composto, as nanoemulsões. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização das nanoemulsão contendo CV. Para obter uma NE estável, fizemos a identificação do HLB do CV pelo método de microemultócrita, assim ao final encontrou-se um valor de HLB de 11. Em seguida, foi feita NEs com variações de concentrações a fim de obter amostras com uma maior estabilidade, variou-se as proporções de CV (3 e 5%), surfactantes (uma mistura de Tween 80® e Span 80®) (2, 5 e 9%) e água (86%, 88%, 90%, 92% e 95%). Das NEs, apenas a com 3% de óleo, 9% de surfactante e 88% de água (NECV) permaneceu estável por até 90 dias. Para obtermos essas amostras, foi utilizada a metodologia de alta energia de emulsificação, onde as NEs passaram por quatro ciclos de homogeneização no aparelho de sonicação e banho de ultrassom. A quantificação de óleo no sistema NECV foi realizada utilizando metodologia analítica desenvolvida no espectrofotômetro de UV-VIS, onde tivemos uma eficiência de encapsulação de $99,45\% \pm 0,019$ (equivalente a 2,98 mg de CV por mL de NE). Em seguida, foi caracterizado quanto ao aspecto macroscópico. Durante os 90 dias, não se observou cremação ou separação de fases, na qual a NECV manteve-se com um tamanho médio de gotícula ($D_{90} = 164.5 \pm 0.69$ nm), potencial zeta ($D_{90} = -14.6 \pm 0.529$ mV), PDI ($D_{90} = 0.118 \pm 0.024$), e pH ($D_{90} = 5.52 \pm 0.011$).

Palavras-chave: Nanoemulsão; Bioativos; Monoterpene; HLB; Sistemas de Liberação.

ABSTRACT

The use of bioactives derived from secondary metabolism of vegetables has become viable for several purposes, so in this work we use Carvacrol oil (CV), CV is a phenolic monoterpene with proven activity in the literature. However, characteristics such as its hydrophobia, ease of oxidation, instability in the presence of light, heat and humidity, can limit its application. Thus, the objective of this work was the development and characterization of nanoemulsion containing CV. To obtain a stable NE, we identified the HLB of the CV by the microemultocrite method, so at the end a HLB value of 11 was found. Then, NEs were made with variations of concentrations to obtain samples with greater stability, the proportions of CV (3 and 5%), surfactants (a mixture of Tween 80® and Span 80®) (2, 5 and 9%) and water (86%, 88%, 90%, 92% and 95%) were varied. Nanoemulsion was composed of 3% oil, 9% surfactant and 88% water (NECV) remained stable for up to 90 days. To obtain these samples, we used the high energy emulsification methodology, where NEs underwent four homogenization cycles in the sonication and ultrasound bath apparatus. Oil quantification in the NECV system was performed using analytical methodology developed in the UV-VIS spectrophotometer, where we had an encapsulation efficiency of $99.45\% \pm 0.019$ (equivalent to 2.98 mg of CV per mL of NE). Next, it was characterized according to the macroscopic aspect. During the 90 days, no cremation or separation of phases was observed, in which NECV remained with an average droplet size ($D_{90} = 164.5 \pm 0.69$ nm), zeta potential ($D_{90} = -14.6 \pm 0.529$ mV), PDI ($D_{90} = 0.118 \pm 0.024$), and pH ($D_{90} = 5.52 \pm 0.011$).

FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Carvacrol	12
Figura 2. Análise do índice de cremação	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O – água/óleo;

cHLB – HLB crítico;

CV – Carvacrol;

HLB – Balanço hidrófilo-lipófilo;

MEs – Microemulsões;

NEs – Nanoemulsões;

O/A – óleo/água;

PDI – Índice de polidispersão;

UV-VIS – Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível.

CVLL – Cavacrolila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
	2.1 Objetivo geral	12
	2.2 Objetivos específicos	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
	3.1 Carvacrol	13
	3.2 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de bioativos	14
	3.3 Nanoemulsão (NE)	15
	3.4 Constituintes do sistema nanoemulsionado	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
	4.1 Materiais:	18
	4.2 Substâncias e Reagentes	18
	4.3 Equipamentos analíticos	18
	Métodos:	19
	4.4 Análise do Balanço Hidrófilo-Lipófilo (HLB)	19
	4.5 Preparação das nanoemulsões para HLB	
	4.6 Análise do HLB	20
	4.7 Preparação da nanoemulsão de CV (NECV)	20
	4.8 Determinação da linearidade da curva analítica	20
5	CARACTERIZAÇÃO	
	5.1 Análise macróscopica	20
	5.2 Zeta	21
	5.3 Determinação do Ph	21
	5.4 Doseamento do óleo no Sistema nanoemulsionado	21
6	RESULTADOS	22

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das décadas, plantas medicinais foram alvos para obtenção de novos compostos com princípios terapêuticos ou para identificação de moléculas que possam ser sintetizadas. Diversos estudos relatam sobre diversas plantas com princípios terapêuticos e seus extratos como *Platonia insignis*, *Citrus limon*, *Eupatorium triplinervi*, *Origanum vulgare*, por exemplo (COSTA JÚNIOR et al., 2010; CAMPÊLO et al., 2011; MARQUES et al., 2011; PIRES et al., 2013).

A *Origanum vulgare*, o orégano, vem sendo estudada por possuir um composto de interesse biotecnológico, o carvacrol. O carvacrol é um monoterpene fenólico primariamente encontrado em óleos essenciais do gênero *Oreganum* e *Thymus* (ANDRE et al., 2016). Este composto vem sendo utilizado majoritariamente na indústria de alimentos. Entretanto, possui ações biológicas diversas como: atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, inseticida, além de apresentar propriedades ansiolíticas e anti-inflamatórias (CETIN e YANIKOGLU, 2006; PRIETO-GARCIA et al., 2007; SOKOVIC et al., 2010; AHMAD et al., 2011; ANTHONY, FYFE e SMITH, 2012; PIRES et al., 2013; MORAES et al., 2013; DAMASCENO et al., 2014).

Uma das características mais importantes para compostos com finalidade terapêutica é sua biodisponibilidade quando administrada, fator este que pode ser alterado com modificação de variáveis como pH, temperatura, luminosidade e concentração de oxigênio, e até mesmo pela digestão, por exemplo. A biodisponibilidade se torna a propriedade farmacocinética crucial à eficácia de um princípio ativo (CAMBRUSSI et al., 2018)

A nanotecnologia se apresenta como estratégia para a síntese, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, os quais poderiam ser úteis na preservação das características originais dos óleos essenciais, por exemplo (PINTO, 2014). No contexto, a nanoencapsulação se destaca como uma técnica promissora, uma vez que tem sido empregada para melhorar as características dos princípios ativos quanto à solubilidade em água e estabilidade térmica, com possibilidade de liberação controlada em concentrações reduzidas (FLORES et al., 2011; HABIB et al., 2012).

Dentre os sistemas nanotecnológicos emulsionados, destacam-se as nanoemulsões (NEs). As NEs apresentam características desejáveis à indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia com considerável estabilidade físico-química e sensorial agradável. O tamanho reduzido das gotículas em dispersão pode apresentar maior facilidade em alcançar o substrato desejado para sua ação (PEREIRA, 2008). Tal sistema apresenta o potencial de carrear bioativos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, uma vez que são, por definição, sistemas dispersos, do tipo água/óleo, bicontínuos ou óleo/água (JAWORSKA et al., 2015).

Os sistemas emulsionados, como as NEs são viáveis para veicular óleos, uma vez que as emulsões são sistemas dispersos constituído de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de pequenas gotículas, devido ao uso de agentes emulsificantes (FERREIRA et al., 2010). Além disso, esses sistemas, oferecem também vantagens adicionais, como a minimização do impacto nas propriedades organolépticas dos produtos alimentícios, bem como uma maior bioatividade, devido ao tamanho subcelular e à melhor difusão (DONSI et al., 2011, 2012).

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver NEs contendo CV e CVLL e avaliá-la.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar um sistema nanoemulsionado contendo Carvacrol e avaliá-lo.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter valor do HLB crítico do CV
- b) Obter NE contendo CV
- c) Quantificar o CV na NE;
- d) Caracterizar a NECV quanto ao aspecto macroscópico, tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Carvacrol

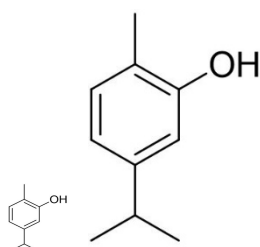
As plantas são fontes de moléculas biologicamente ativas, dentre elas os metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Enquanto os metabólitos secundários protegem as plantas contra patógenos e herbívoros, funcionam como agentes de competição entre as plantas, além de servirem como atrativos para polinizadores. As moléculas provenientes deste metabolismo secundário são os terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que apresentam uma grande diversidade e complexidade estrutural. Dentre estas moléculas encontram-se aquelas que fazem parte da constituição dos óleos essenciais (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixa massa molecular e geralmente odoríferos (SILVA, 2018). São obtidos por meio de isolamento por destilação por arraste a vapor d'água, pressão ou extração por solvente, como são metabólitos secundários sintetizados a partir de plantas aromáticas, sendo seus principais constituintes fenóis, terpenos e aldeídos (ALMEIDA, 2015).

Análises físico-químicas dos óleos essenciais demonstram que estes são constituídos por diversos compostos, entre eles, os hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas entre outros, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES et al., 2004). O composto majoritário são os terpenóides, sendo classificados pelo número de carbonos, o resultante do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), que cada vez mais são estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003).

O CV (Figura 1), também conhecido como isopropil-*o*-cresol, ρ -cimeno-2-ol, 5-iso-propil-2-timol ou iso-timol, com fórmula molécula de C₁₀H₁₄O, massa molecular de 150,22 g mol⁻¹ e Log*P* 3,52 (DE VINCENZI et al., 2004; ARFA et al., 2006), é um monoterpene fenólico, líquido à temperatura ambiente, pertencente aos óleos essenciais produzidos por uma grande variedade de plantas aromáticas como, Cominho-Preto (*Nigella sativa* L.), Manjerona (*Origanum majorana* L.), Orégano (*Origanum vulgare* L.) e Tomilho (*Thymus vulgaris* L.), além de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e Alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis* Schauer), sendo este último encontrado abundantemente no Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2015).

Figura 1. Estrutura química do Carvacrol



Esse composto é reconhecido como um aditivo seguro para alimentos e agente aromatizante em bebidas e goma de mascar (OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, possui ações biológicas diversas como: atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, inseticida, gastroprotetora, além de apresentar propriedades ansiolíticas, anti-inflamatórias, antinociceptivas e antitrombóticas (SILVA et al., 2012; PIRES et al., 2013; MORAES et al., 2013; DAMASCENO et al., 2014).

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

3.2 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de bioativos

A nanotecnologia é um fenômeno recente e se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, havendo uma concordância da nanotecnologia com outras disciplinas como as ciências farmacêuticas, ciência dos materiais, informática, biologia celular e molecular, resultando, assim, em uma revolução tecnológica, que gerará um maior impacto no futuro devido aos seus potenciais usos no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (ROJAS-AGIRRE, AGUADO-CASTREJÓN, GONZÁLES-MÉNDEZ, 2016). Estratégias específicas como a nanotecnologia podem ser empregadas a fim de obter melhor biodisponibilidade e eficácia de bioativos no organismo. A nanotecnologia é um conjunto de técnicas, tecnologias e processos de preparação, caracterização, manipulação de átomos ou moléculas buscando o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, com propriedades físicas, químicas e biológicas relacionadas ao tamanho das partículas (CAMBRUSSI et al., 2018).

Assim, a nanotecnologia, por meio do encapsulamento promove proteção dos óleos essenciais contra a degradação por agentes físicos e químicos, tais como umidade, luz, oxigênio ou calor capazes de alterar a sua qualidade, conseqüentemente, resultando na redução da volatilidade, promovendo maior estabilidade dos seus componentes (BASER; BUCHBAUER, 2010; PINTO, 2014).

Outra contribuição no processo de encapsulação é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra gradativamente, ou a partir da ocorrência de um certo estímulo, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento ou dissolução. Esse conceito é chamado de *liberação controlada*, e pode-se referir ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação (SUAVE et al., 2006; PINTO, 2014).

Assim, a nanotecnologia tem proporcionado novas descobertas para a formação, caracterização e aplicação destes sistemas emulsionados em muitos ramos da ciência e tecnologia (SANTOS et al., 2017).

3.3 Nanoemulsão (NE)

Sistemas dispersos consistem em uma fase dispersa, dispersa na forma de partículas ou gotículas na fase contínua. Essas dispersões podem ser do tipo coloidais, na qual o tamanho médio de gotículas varia entre 1 nm a 1 mm (ATTWOOD, 2016). Exemplos de sistemas coloidais são as nanoemulsões (NEs) e microemulsões (MEs), onde suas principais diferenças são o tamanho do diâmetro da gotícula e estabilidade termodinâmica. (OSTERTAG, WEISS; McCLEMENTS, 2012; LOVISON, 2017).

As NEs são dispersões com tamanho de gotícula na faixa de 200 a 500 nm. São constituídas por uma fase hidrofílica, uma fase lipofílica e tensoativos. Apresentam aspecto transparente e/ou translúcido devido ao tamanho reduzido da gotícula e sua aparência e textura tornam-se mais atraentes para o consumidor. Tem sido bastante investigada devido a sua simples obtenção, e sua estabilidade, que devido ao tamanho das gotículas, previne processos de instabilidade como cremação, floculação e coalescência. Devido a sua maior área superficial promove um aumento na biodisponibilidade de fármacos veiculados na sua estrutura (SEIBERT, 2015; WALKER et al., 2015, ROLIM, 2016).

Diferentes das MEs, que são sistemas termodinamicamente estáveis, as NEs são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo, além de poderem ser biodegradáveis e biocompatíveis. Tais características, bem como, redução na quantidade de tensoativos e possibilidade de serem diluídas com água sem perda de sua estrutura original são vantagens apresentadas por esse sistema e tornam-no preferência para veicular fármacos lipofílicos quando comparado a outros modelos de liberação de substâncias (MASON et al., 2006; FRAGA, 2007; SEIBERT, 2015; ROLIM, 2016).

Dentro desta perspectiva, o desenvolvimento de nanopartículas como sistemas de carregamento de drogas pode melhorar a eficácia e farmacocinética de moléculas bioativas. As nanopartículas apresentam enorme versatilidade para carrear fármacos, quando comparada as formas farmacêuticas convencionais. Com o bioativo aprisionado na nanopartícula, alterações estruturais e funcionais da molécula de interesse são minimizadas, enquanto a solubilidade e permeabilidade do sistema se tornam mais eficientes, minimizando problemas de biodisponibilidade e biocompatibilidade (REIS et al., 2013; MELO, 2016; BADRI et al., 2017).

3.4 Constituintes do sistema nanoemulsionado

A seleção de constituintes para o sistema nanoemulsionado deve ser feita considerando as características do composto que será incorporado no sistema, além de particularidades como, a via de administração e sua biocompatibilidade. A escolha da fase interna do sistema líquido emulsionado é muito importante uma vez que, permite a obtenção do próprio sistema e das características do bioativo veiculado. Uma grande variedade de triglicerídeos, ésteres oleosos semi-sintéticos, glicerídeos parciais e ésteres semi-sintéticos não-iônicos estão disponíveis para utilização como fase interna (STRECK, 2017).

Os triglicerídeos são altamente lipofílicos e sua capacidade solvente para bioativos é

geralmente uma função da concentração eficaz dos grupos ésteres, assim, um triglicerídeo de cadeia média (MCT) geralmente tem maior capacidade solvente que um triglicerídeo de cadeia longa (LCT) (POUTON; PORTER, 2008). O Miglyol[®]812 (MCT), predominantemente C8 e C10, é bastante utilizado em sistemas emulsionados, por ser conhecido como inibidor de amadurecimento de Ostwald. O amadurecimento de Ostwald consiste no crescimento do raio da gotícula e na diminuição do número total das gotículas dispersas, tal efeito evidencia a condição de um sistema termodinamicamente instável, ou seja, um processo que não é espontâneo. Esse efeito leva a separação de fases com o passar do tempo (FRANZOL; REZENDE, 2015).

O MCT é usado para aumentar a estabilidade de emulsões (RYU et al., 2018). Enquanto os tensoativos são componentes essenciais para a formação de sistemas do tipo óleo em água (O/A). Os tensoativos não iônicos são os mais aplicados no desenvolvimento de sistemas de liberação de bioativos, uma vez que sua concentração micelar crítica é geralmente muito menor que de tensoativos iônicos, dessa forma sendo menos irritantes e mais tolerados (SHINODA et al., 1969). O uso de tensoativos garante o tamanho pequeno das gotículas, além de evitar a coalescência, amadurecimento de Ostwald e a colisão entre as gotículas das NEs (KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018).

A adição de um tensoativo não iônico, assim como o sinergismo de diferentes tensoativos, como o Tween[®]80 e Span[®]80, melhoram a estabilidade dos sistemas, influenciando os ângulos de contato e forças de interação (TIAN; CHEN; ZHANG, 2015).

Outro fato importante para estabilidade das NEs é o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), um parâmetro adimensional que caracteriza o comportamento de um tensoativo dentro de um sistema composto por tensoativo/óleo/água, na qual considera a influência das propriedades da fase oleosa, como o tipo de óleo, as propriedades de fase aquosa e os fatores ambientais, como a temperatura, na afinidade relativa de um tensoativo para as fases de óleo e água (McCLEMENTS;).

Griffin (1949) foi o primeiro pesquisador a criar uma técnica baseada no HLB para a escolha ideal de tensoativos para se obter o tipo de emulsão desejada, óleo/água (O/A) ou água/óleo (A/O). Nesse sistema, cada tensoativo é classificado de acordo com seu próprio valor de HLB, onde tensoativos hidrofílicos têm um valor alto de HLB (geralmente acima de 10), enquanto tensoativos lipofílicos têm valores variando de 1 a 10. Surfactantes com auto equilíbrio entre as porções lipofílicas e a hidrofílicas são extremamente eficientes como agentes emulsificantes, pois tendem a se concentrar na interface O/A (MACEDO, 2006).

No entanto, o sistema HLB nunca fornece informações quanto a quantidade de

surfactantes deve conter em um sistema emulsionado. Por isso, depois de determinar a mistura correta necessária para gerar o HLB ideal para uma NE, o que é conhecido por HLB crítico (cHLB). Em seguida, várias formulações devem ser preparadas com o mesmo cHLB com concentrações variadas dos componentes. O sistema escolhido deve ser aquele com maior estabilidade (MACEDO, 2006). Por não se conhecer o valor do HLB do sistema, foi feito um estudo com diversas emulsões contendo Tween[®]80, Span[®]80 e CV, para assim verificar o real valor e obter uma formulação com uma maior estabilidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.2 Substâncias e Reagentes

- Carvacrol (**5-isopropyl-2-metinfenol**), **Sigma – Aldrich (Missouri - EUA)**;
- Triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico (Miglyol 812[®]), **Sasol (Witten - Alemanha)**;
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]), **Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro - Brasil)**;
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®]), **Sigma – Aldrich (Missouri - EUA)**;
- Etanol, **Merck (Barueri - Brasil)**;

4.3 Equipamentos analíticos

- Balança analítica (modelo AUW220D- SHIMADZU);
- High intensity ultrasonic (modelo QR200 - ULTRONIQUE);
- Banho de ultrassom (modelo 14000^a – Unique);
- Microcentrífuga (modelo Q10.500, Quimis);
- Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível (modelo GENESYS 10S, Thermo Scientific);
- Zetasizer (modelo Nano ZS, Malvern);
- pHmetro digital (modelo pH 250, PoliControl).

4.4 Análise do Balanço Hidrófilo-Lipófilo (HLB)

Para obtermos o valor do HLB do CV foram feitas 8 nanoemulsões com o fármaco Carvacrol e com variação nas concentrações de surfactantes. Utilizamos 2 tipos de surfactantes: um lipofílico [Span 80®, HLB = 4.3] e outro hidrofílico [Tween 80®, HLB = 15]. Obtemos como resultado que o HLB através das somas da variação dos HLB, em cada sistema obtivemos a variação entre 8 e 15 de acordo com a proporção cada surfactante.

Tabela 1. Composição de cada formulação de acordo com concentração de surfactante (%)

Formulação	TWEEN 80		SPAN 80		Valor final do HLB
	(%)	HLB	(%)	HLB	
F1	100	15	0	0	15
F2	91	13,65	9	0,39	14
F3	82	12,3	18	0,77	13
F4	72	10,8	28	1,20	12
F5	63	9,45	37	1,59	11
F6	54	8,1	46	1,98	10
F7	44	6,6	56	2,41	9
F8	34,5	5,17	65,5	2,82	8

Fonte: Dados da pesquisa, (2020).

4.5 Preparação das emulsões para a análise HLB

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de ultrasonicação, e submetidas a 4 ciclos de homogeneização em aparelho de sonicação por 1 minuto a 300W com banho de gelo, seguido de banho de ultrassom por 1 minuto. A composição de cada emulsão era de 5% de CV, 2% de surfactantes e 93% de água. E ao final, obtivemos 8 emulsões do tipo O/A.

4.6 Análise do HLB

A metodologia utilizada para definir a estabilidade das nanoemulsões, foi através do método de Estabilidade a Curto Prazo; esta estabilidade foi avaliada pela técnica do

microemultócrito (MET) (Macedo et al., 2006). As formulações foram armazenadas fechadas em temperatura ambiente e não foram homogeneizadas antes do teste. Os tubos capilares isentos de heparina foram preenchidos a 75% com cada formulação e colocados em uma microcentrífuga a 10.500 rpm por 10 min. A avaliação foi realizada à temperatura ambiente nos dias de armazenamento 1 (D1) e 30 (D30). Após o ciclo de centrifugação, a formulação com menor índice de cremação foi escolhida de acordo com o valor de HLB para o CV. Todas as formulações foram feitas em triplicata.

4.7 Preparação da nanoemulsão de CV (NECV)

Com os resultados do HLB, formulamos uma NE contendo o óleo com o HLB específico. A NECV foi preparada pelo método de ultrasonicação, os componentes foram submetidos a quatro ciclos de homogeneização em um aparelho de sonicação por 1 minuto a 300 W de potência usando um banho de gelo, seguido de um banho de ultrassom por 1 minuto. A NE selecionada foi composta por 3% de óleo de CV, 9% de surfactantes (mistura de Tween 80® e Span 80® com HLB 11) e 88% de água. Na NE branca, o CV foi substituído pelo Mygliol 812®.

4.8 Determinação da linearidade da curva analítica

A linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi determinada pela obtenção da curva analítica, a partir da diluição da solução padrão do óleo em solução estoque preparada com um diluente (1:1), tampão salino tamponado com fosfato (PBS, pH 7,4) e etanol. A partir desta solução, a curva analítica foi construída nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL, utilizando-se a solução de estoque de PBS e etanol como solvente. A curva analítica foi preparada e analisada em triplicata em um espectrofotômetro. A curva analítica e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear ($y = 0,0152 x - 0,0089$ $R^2 = 0,9978$).

5- Caracterização da NECV

5.1 Análise macroscópica

A estabilidade da NECV foi avaliada em 30 dias observando separação de fases, aspectos visuais como cor e cremação. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de 8 °C.

5.2 Determinação do tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta

A determinação do tamanho de gotícula, PDI e distribuição foram obtidas em equipamento Zetasizer, pela técnica de espalhamento de luz dinâmica. Antes da medição, as emulsões foram diluídas em água deionizada (1:25 v/v). O potencial zeta das gotículas foi avaliado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas em solução de KCL 0,1 mM (1:25) e adicionadas em células eletroforéticas. Todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados em média e desvio padrão (\pm).

5.3 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado em pHmetro digital com eletrodo de vidro, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

5.4 Doseamento do óleo no sistema nanoemulsionado

A quantificação do óleo na formulação foi desenvolvida em espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis). Foram feitas diluições em solução estoque de PBS/etanol (1:1) na proporção de 1:2000, em triplicata. Após as diluições foi feita a leitura em absorbância no espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda (λ) de 276 nm. O valor médio da absorbância foi utilizado para determinação da concentração real da amostra por meio da equação da reta obtida durante a determinação da curva analítica em espectrofotômetro (MACEDO, 2006).

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos através da metodologia utilizada, foi o total de 8 formulações (Tabela 2) que passaram pelo teste de estabilidade de curto prazo, onde foi determinado o valor HLB, sua estabilidade durante 30 dias e os aspectos macroscópicos, como apresentado na figura 2 temos em um gráfico no eixo x as formulações e no eixo y o resultado de cremação das amostras e o resultado confirma a amostra F5 como a amostra que se mostrou mais estável no prazo final dos 30 dias.

Para obtermos o valor final de HLB, foi realizado o equilíbrio hidrofílico lipofílico, e obtivemos o valor de HLB através diferentes concentrações de Tween e Span 80 e para chegar ao resultado, foi feita a soma dos HLB de ambos tensoativos.

Ao analisarmos a tabela 5, que corresponde a curva analítica do Carvacrol, podemos perceber que através análises estatísticas obtivemos o valor de R^2 que quanto mais próximo de 1 mais explicativo é o modelo linear, sendo assim significativo o estudo da Carvacrolila.

Tabela 2: Análise do índice de cremação (%) das NEs para o estudo de estabilidade de curto prazo.

Formulação	valor HBL	D1	D30	Aspectos Macroscópicos
F1	15	4,76	5,36	M + CR
F2	14	3,90	4,84	M + CR
F3	13	3,64	5,74	M + CR
F4	12	4,41	3,23	M + CR
F5	11	1,61	1,96	M
F6	10	4,76	3,57	M + CR
F7	9	5	6,98	PS
F8	8	5,56	6,90	PS

F: formulação; D: dia; HLB: Balanço lipofílico hidrofílico; M: aspecto leitoso; CR: cremação; PS: separação de fases.

A Figura 2 apresenta o estudo de estabilidade de curto prazo pela técnica de microemultócrito nos dias (D)1 e (D) 30.

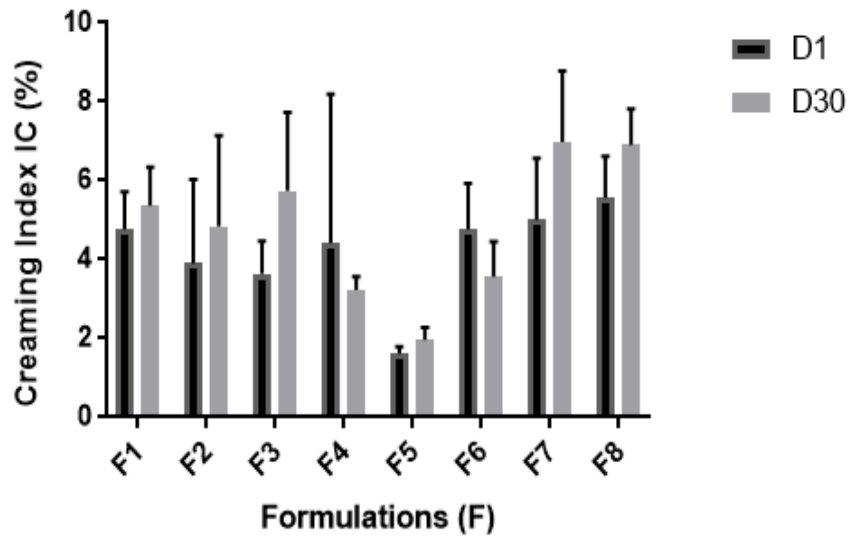


Figura 2. Análise do índice de cremação [CI %] das formulações contendo o Carvacrol.



Imagem 1: Características macroscópica da nanoemulsão sem a presença de cremação ou separação de fases.

Tabela 3: Parâmetros de estabilidade: diâmetro médio da gotícula, potencial zeta, índice de polidispersão e pH de nanoemulsão com óleo carvacrol e nanoemulsão sem óleo de carvacrol ao longo de 30 dias.

Formulação	D1				D30			
	Diâmetro médio da gotícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH	Diâmetro médio da gotícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
NE	123.66 ± 1.241	0.183 ± 0.021	-13.00 ± 0.659	5.60 ± 0.021	128.23 ± 0.685	0.220 ± 0.004	-12.63 ± 0.381	5.71 ± 0.031
	125.41 ± 0.782		-26.37 ± 0.587	5.43 ± 0.040				5.32 ± 0.032
NECV								
Formulação	D1				D30			
	Diâmetro médio da gotícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH	Diâmetro médio da gotícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
NE	127.73 ± 0.069	0.193 ± 0.018	-16.93 ± 0.055	5.85 ± 0.051	124.46 ± 0.455	0.176 ± 0.009	-14.66 ± 0.550	5.86 ± 0.036
	169.57 ± 2.611		-17.37 ± 0.115	5.43 ± 0.032				5.52 ± 0.011
NECV								

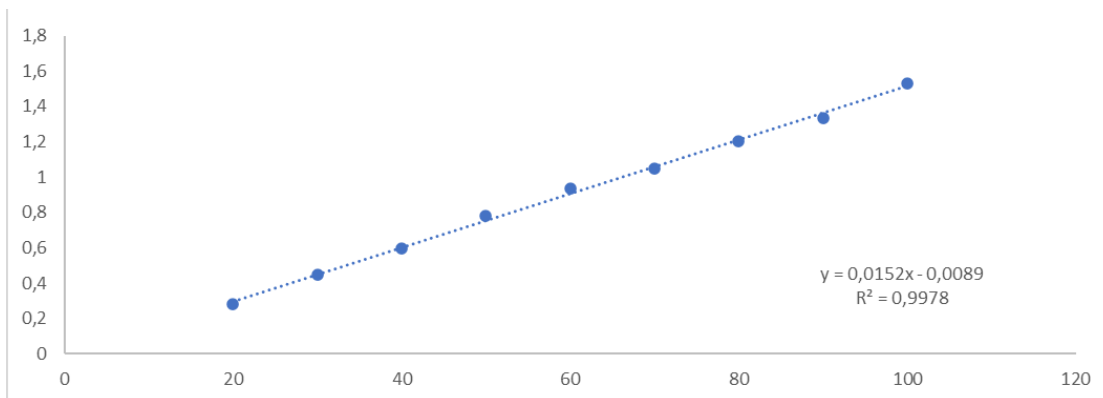
NE: nanoemulsão branca ; NECV: nanoemulsão com óleo de carvacrol; D1: Dia 1; D30: Dia 30; PDI: índice de polidispersão

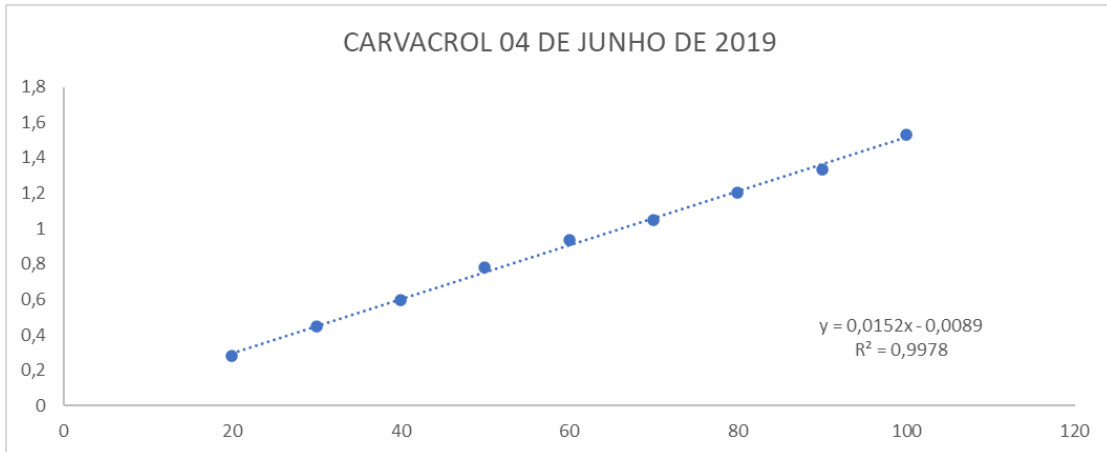
Tabela 4: Equilíbrio hidrofílico-lipofílico de acordo com a composição surfactante (%).

Formulação	TWEEN 80		SPAN 80		Final HLB valor
	(%)	HLB	(%)	HLB	
F1	100	15	0	0	15
F2	91	13,65	9	0,39	14
F3	82	12,3	18	0,77	13
F4	72	10,8	28	1,20	12
F5	63	9,45	37	1,59	11
F6	54	8,1	46	1,98	10
F7	44	6,6	56	2,41	9
F8	34,5	5,17	65,5	2,82	8

F: formulação; D: dia; HBL: equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

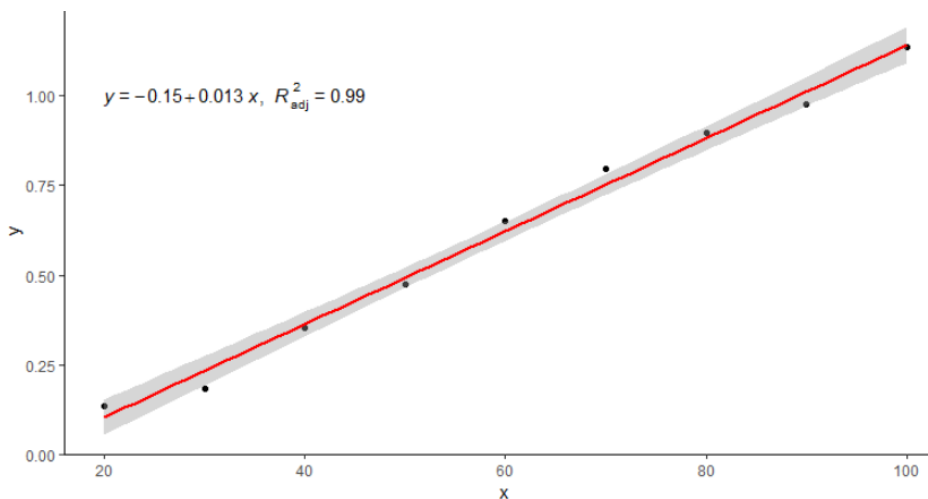
Na figura 4 a curva analítica do carvacrol, e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear ($y = 0,0152x - 0,0089$ $R^2 = 0,9978$).

Figura 4: Curva analítica do Carvacrol



Na Figura 4, temos o resultado da equação da reta obtida através da leitura em triplicata das médias das absorvâncias das nanoemulsões em diferentes concentrações, ao analisarmos a reta essa margem cinza é o intervalo de confiança, a linha vermelha é onde esperamos encontrar os valores das amostras, e ao analisarmos a distribuição todos os pontos das amostras se encontram dentro do intervalo de confiança.

Figura 5: Gráfico de Linearidade



Na Tabela 5 e 6 foi realizado ANOVA one-way para cada fármaco, e observamos o p-valor do Carvacrol foi significativo ($p < 0,05$).

Tabela 5 : ANOVA one-way do Carvacrol

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Somas de quadrados	Quadrados médios	F	p-valor
Concentração	8	3,758	0,4697	19,94	1,87e(-07)
Resíduos	18	0,424	0,0236	-	-
Total	26	4,182	-	-	-

Por seguinte foi realizado o teste de Tukey, onde na Tabela 7 estão representados as diferentes concentrações e se possui diferenças significantes ou não entre as amostras; ao analisarmos os valores nomeamos como S na tabela todos valores que são significativos e N os valores que não são significativos.

Tabela 7: Teste de Turkey do Carvacrol

	10	20	30	40	50	60	70	80
20	S							
30	S	S						
40	N	S	S					
50	S	S	N	S				
60	S	N	N	S	N			
70	N	S	S	N	S	S		
80	S	S	N	S	N	N	S	
90	S	N	N	S	N	N	S	N

5 Conclusão

Com a análise dos resultados obtidos pode-se concluir que através estudo do HLB foi possível desenvolver uma NE com uma maior estabilidade, eficaz para a caracterização quanto ao diâmetro médio das gotículas, PDI e potencial zeta. A NECV se manteve estável ao longo dos 90 dias; através das análises estatísticas obtivemos o valor de R^2 que o mais próximo de 1 é considerado um modelo linear explicativo, ou seja, melhor ele se ajusta à amostra; e os valores obtidos no estudo foram significativos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 41-40, 2011.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Universidade Federal de São João del-Rei, São João del Rei, 2015.

ALVARANGA, E. M.; SOUSA, N. A.; ARAÚJO, S.; JÚNIOR, J. L. P.; ARAÚJO, A. R.; ILES, B.; PACÍFICO, D.MV.; BRITO, G. A. C.; SOUZA, E. P.; SOUSA, D. P.; MEDEIROS, J. V. R. Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, p. 1773-1785, 2017.

ANDRE, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C.; CAVALCANTE, G. S.; SANTOS, J. M. L.; MACEDO, I. T. F.; PAULA, H. C. B.; FREITAS, R. M.; MORAIS, S. M.; MELO, J. V. M.; BEVILAQUA, C. M. L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.

ATTWOOD, D. Sistemas Dispersos. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components—a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol**, v. 21, p. 462-468, 2005.

ARFA, A. B.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOYY, L.; GONTARDE, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, 2006.

BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q. A.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 516, p. 238-244, 2017

CAMBRUSSI, A. N. C. O.; CONCEIÇÃO, I. D.; FREITAS, A. R.; SANTOS, P. S.; SOUSA, R. R. M.; EIRAS, C.; RIBEIRO, A. B. O papel da nanotecnologia na redução do estresse oxidativo: uma revisão. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2018.

CAMPÊLO, L. M. L.; DE LIMA S. G.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R. M.; Evaluation of central nervous system effects of Citrus limon essential oil in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 668-673, 2011.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. C. I. Avanços e desafios na produção in vitro de metabólitos secundários de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CETIN, H.; YANIKOGLU, A.; A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. **Journal of Vector**, v. 31, p. 118-122, 2006.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; HENRIQUE, J. A. P.; SAFFI, J. Evaluation of effects of ethanolic extract from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 747-753, 2010.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F. C.; SILVA, I. S. S.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, R. O.; SOUSA, D. P.; BARBOSA, A. L.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Science**, v. 94, p. 58-66, 2014.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342-350, 2012.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 637-646, 2003.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; SOUZA, T. P.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, E. E.; SOARES, L. A. L. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1383-1390, 2010.

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

FRAGA, M. **Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas: estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRANZOL, A.; REZENDE, M.C. Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v.25, p.1-9, 2015.

Griffin, W.C. (1949) Classificação de Agentes Superfície-Ativos por "HLB". **Jornal de Ciência Cosmética**, 1, 311-326

HABIB, S. M; AMR, A. S.; HAMADNEH, I. M. Nanoencapsulation of Alpha-linolenic Acid with Modified Emulsion Diffusion Method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 695-703, 2012.

HADARUGA, N. G. Ficaria verna Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2012.

JAWORSKA, M. SIKORA, E.; OGONOWSKI, J.; KONIECZNA, M. Study of O/W micro - and nanoemulsions based on propylene glycol diester as a vehicle for geranic acid. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 2, p. 229-233, 2015.

KOROLEVA, M.; NAGOVITSINA, T.; YURTOV, E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 10369-10377, 2018.

LOVISON, M. M. **Óleo essencial de orégano nanoemulsionado: produção, caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* e aplicação em patê de frango**. 2017, 128 f. Tese (Doutorado em Ciências de Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassungua, 2017.

MACEDO, J. P. F.; FERNANDES, L. L.; FORMIGA, F. R.; REIS, M. F.; NAGASHIMA, T.; SOARES, L. A. L.; EGITO, E. S. Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, E1-E7, 2006.

MARQUES, T. H. C.; CARDOSO, K.M.F.; ALMEIDA, A.A.C.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R. M. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with Bellis perennis in pilocarpine-induced seizures. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 338-344, 2011.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 635-666, 2006.

MELO, C. O. **Estudo de pré-formulação de nanopartículas poliméricas para veiculação da L-asparaginase**. 2016. (Monografia). Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campina Grande, PB. 47 p..

MORAES, J. M.; CARVALHO, A. A. L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A. C.; MARQUES, T. H. C.; ANDRADE, L. N.; FREITAS, R. M.; SOUSA, D. P. Anthelmintic activity of carvacril acetate against *Shistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603-610, 2013.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F. S. C.; SANTOS, M. R. V. dos; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesion in rodents. **Naunyn-Schmiedberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899-908, 2012.

OSTERTAG, F., WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 388, n. 1, p. 95-102, 2012.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e**

fotoprotetor das emulsões. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PINTO, N. O. F. **Desenvolvimento de nanoformulações do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; DE ALMEIDA, A. A.; SILVA, O. A.; SANTOS CERQUEIRA, G.; DE SOUSA, D. P.; PIRES, R. M.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R. M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 112, p. 42-48, 2013.

PRIETO-GARCIA, J.M.; IACOPINI, P.; CIONI, P.; CHERICONI, S. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 889-895, 2007.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 625-637, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J; BARRETO, R. S; MENEZES, P. P; ALMEIDA, J. R; VIANA, A. F; OLIVEIRA, R. C; OLIVEIRA, A. P; GELAIN, D. P; DE LUCCA JÚNIOR, W; ARAÚJO, A. A. β -Cyclodextrin complexed (-)-linalool produces antinociceptive and anti-inflammatory effects superior to those of (-)-linalool in experimental protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, p.167-72, 2013.

REIS, C. P.; JERÓNIMO, A. R.; PINTO, P.; SILVA, C. O.; CANDEIRAS, S. Nanopartículas de PCL com acetato de hidrocortisona como uma terapia dermatológica inovadora para a dermatite atópica. **Biopharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 73-82, 2013.

ROJAS-AGIRRE, Y.; AGUADO-CASTREJÓN, K.; GONZÁLES-MÉNDEZ, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? **Educación Química**, v. 27, n. 4, p. 286-291, 2016.

ROLIM, F. N. A. **Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*).** 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

RYU, V.; MCCLEMENTS, D. J.; CORRADINI, M.G.; YANG, J. S.; MCLANDBOROUGH, L. Sistemas naturais de entrega antimicrobiana: Formulação, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação de nanoemulsões de carvacrol estabilizadas com saponina quillaja. **Hidrocolóides Alimentares**, v. 82, p. 442-450, 2018.

SANTOS, I. C. V. M.; MARTELOTI, R. R.; OLIVEIRA, P. F.; MANSUR, C. R. E. Development of microemulsions to reduce the viscosity of crude oil emulsions. **Fuel**, v. 210, p. 684-694, 2017.

SEIBERT, J. B. **Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: Avaliação da sazonalidade e atividades biológicas.** 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

SILVA, N. E. S. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e emulsões gel-like para uso tópico local**. 2012. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

SHINODA, K. e SAITO, H. (1969) A Estabilidade de Emulsões do Tipo O/A como Funções da Temperatura e o HLB de Emulsionantes: A Emulsificação pelo Método PIT. **Jornal de Coloide e Interface Science**, 30, 258-263.

STRECK, L. **Nanoemulsões biocompatíveis para o tratamento da doença de Chagas**. 2017. 130 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; MARIN, P. D.; BRKIĆ, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, p. 12-20, 2006.

TIAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, W. Influence of Ionic Surfactants on the Properties of Nanoemulsions Emulsified by Nonionic Surfactants Span 80/Tween 80. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, p. 1511-1517, 2018.

WALKER, R.M.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, v.164, p.10-20, 2015.