



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

GABRIELA BAPTISTA DE ASSIS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ALECRIM - *Rosmarinus officinalis* Linn. (LAMIACEAE)**

CAMPINA GRANDE – PB

2014

GABRIELA BAPTISTA DE ASSIS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ALECRIM - *Rosmarinus officinalis* Linn. (LAMIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Me. Geovani Pereira
Guimarães

CAMPINA GRANDE – PB
2014

É expressamente proibida 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 da dissertação.

A848d Assis, Gabriela Baptista de.
Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo óleo essencial de alecrim - *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) [manuscrito] / Gabriela Baptista de Assis. - 2014.
49 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em FARMÁCIA) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.
"Orientação: Geovani Pereira Guimarães, Departamento de Farmácia".

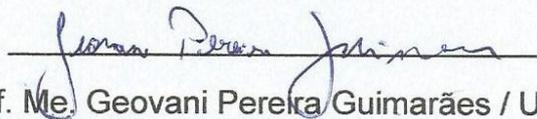
1. Alecrim. 2. Microemulsão. 3. Fitoterapia. I. Título.
21. ed. CDD 615.321

GABRIELA BAPTISTA DE ASSIS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ALECRIM - *Rosmarinus officinalis* Linn. (LAMIACEAE)**

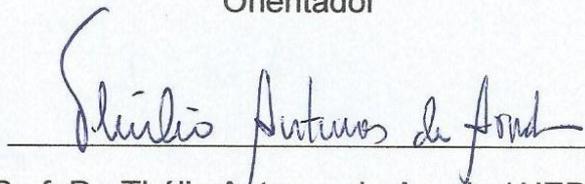
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 01/12/2014.



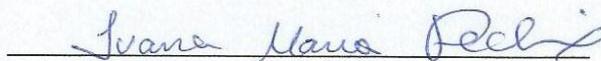
Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães / UEPB

Orientador



Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda / UEPB

Examinador



Profª Drª Ivana Maria Fechine / UEPB

Examinadora

A Deus, força motriz da vida e aos meus familiares, pelo amor, dedicação e apoio de sempre, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos e pela força para superar as dificuldades, que impulsionam o crescimento;

Ao Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães pela orientação e apoio, pela oportunidade de trabalho e de ampliar minha visão científica, por todos os ensinamentos e experiências passados, por todos os momentos em que me incentivou a buscar as respostas, por toda sua competência e dedicação e, acima de tudo, pela paciência, compreensão e amizade;

Aos professores do curso de Farmácia da UEPB, por toda boa vontade e disponibilidade em repassar o conhecimento e a experiência, contribuindo para a formação de profissionais cada vez melhores;

À coordenação do Curso de Farmácia atual, representada pelas Profs. Nícia e Rosemary, que não mediram esforços para me ajudar a concluir essa etapa;

Aos funcionários da UEPB, sempre nos auxiliando nos bastidores;

A todos do LDCPF (Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos), pela experiência compartilhada, pela cooperação quando necessária e pelos momentos de descontração em que pudemos criar laços de amizade. Em especial: a Jamilly, minha primeira mentora; Yargo, companheiro dessa trajetória desde o início; Dayanne e Camilla, por toda a companhia, ajuda e bons momentos vivenciados;

Aos meus pais, que em meio a tantas dificuldades e decepções, nunca mediram esforços para minha educação e para que eu me tornasse uma pessoa responsável e de caráter;

Aos meus avós, irmãos, tios e tias, primos e primas, por todo incentivo e compreensão nas horas necessárias;

À minha sobrinha, Maria Manuela, que me faz melhor a cada dia para ser um exemplo em que ela possa se espelhar futuramente;

A Moab, companheiro e amigo em todas as horas, pelas inúmeras ajudas, fosse para buscar um artigo, para falar com alguém, para me cobrar resultados, para me incentivar a nunca desistir, para me dizer que ia dar tudo certo ou simplesmente para estar lá, do meu lado. Por todo apoio, confiança e por acreditar em mim mais que eu mesma. Pela paciência, carinho, cuidado e preocupação. Nessa trajetória turbulenta de toda a graduação, tudo seria mais difícil se não tivesse você aqui... Muito, muito, muito obrigada!;

A todos os colegas de turma, por todos os momentos vividos em meio a toda essa pressão. Sei da capacidade e competência de cada um. Sucesso a todos!;

Especialmente, aos verdadeiros presentes que ganhei durante esse curso: Guilherme, Renata, Simone e Susana! Verdadeiros amigos que levarei para a vida toda!

Aos meus amigos da SEJA, por depositarem confiança e por se preocuparem comigo em todos os momentos, oferecendo sua sincera amizade;

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

*“Se você não mudar a direção, terminará
exatamente onde partiu.”*

Antigo Provérbio Chinês

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM - *Rosmarinus officinalis* Linn. (LAMIACEAE)

ASSIS, Gabriela Baptista de¹; GUIMARÃES, Geovani Pereira².

RESUMO

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* - Lamiaceae) é amplamente utilizado na medicina popular há séculos por conter metabólitos secundários responsáveis por diversas atividades biológicas tais como a atividade antioxidativa e antimicrobiana. Estudos comprovam inclusive o sinergismo entre este óleo e fármacos antimicrobianos. Microemulsões (ME) são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes formados a partir de uma mistura de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizada por um filme interfacial de tensoativos. Devido a características como facilidade de preparação, estabilidade termodinâmica e alta capacidade de solubilização, as MEs representam alternativas interessantes no campo farmacêutico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar microemulsões contendo óleo essencial de alecrim (OEA). O sistema tensoativo foi composto por Kolliphor[®] EL e Plurol[®] Oleique, e para a fase oleosa utilizou-se o OEA. Diagramas de fase pseudoternários foram construídos por inspeção visual das misturas de tensoativos (proporções 4:1 a 1:1) com a fase oleosa e água deionizada (fase aquosa), à temperatura ambiente. Foram selecionadas formulações a partir do diagrama 4:1 para caracterização quanto ao aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração e estabilidade preliminar. As características físico-químicas avaliadas sugerem que elas possam ser utilizadas pelas vias oral e tópica. Os sistemas apresentaram alta estabilidade de curto prazo. O desenvolvimento de microemulsões contendo óleo essencial de alecrim mostrou-se satisfatório, porém necessita de maiores estudos, inclusive para comprovação de sua eficácia como alternativa terapêutica ou auxiliar aos antimicrobianos utilizados na atualidade.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial de alecrim. Microemulsão. *Rosmarinus officinalis*.

¹ Graduação em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba. gabrielabdassis@gmail.com

² Professor do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. geovanipguimaraes@gmail.com

ABSTRACT

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* - Lamiaceae) essential oil has been widely used in folk medicine over the centuries thanks for its secondary metabolites, responsible for various biological activities, such as antioxidative and antimicrobial activity. Studies even show the synergy between this oil and antimicrobial drugs. Microemulsions (ME) are thermodynamically stable, isotropic and transparent systems formed from a blend of two immiscible liquids, usually water and oil, stabilized by an interfacial film of surfactants. Due to features like easy preparation, thermodynamic stability and high capacity of solubilization, MEs represent interesting alternatives on pharmaceutical field. The aim of this work was to develop and characterize microemulsions with rosemary essential oil (REA). The surfactant mix was composed of Kolliphor[®] EL and Plurol[®] Oleique. For oil phase, REA was utilized. Pseudoternary Phase Diagrams were made by visual inspection of surfactant mix (4:1 to 1:1 proportions) with oil phase and deionized water (aqueous phase), at room temperature. Formulations were selected from 4:1 diagram to characterize them as for macroscopic aspect, pH, electric conductivity, refraction index and preliminary stability. Physicochemical properties evaluated suggests that all formulations can be used orally and topically. Systems showed high short-term stability. The development of microemulsions containing rosemary essential oil was satisfactory, although needs further studies, including evidence of its effectiveness as a therapeutic alternative or auxiliary to current antimicrobial.

KEYWORDS: Rosemary essential oil. Microemulsion. *Rosmarinus officinalis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais compostos terpênicos encontrados no óleo essencial de alecrim.....**22**
- Figura 2** – Diagramas de Fase Pseudoternários para o sistema de óleo de alecrim, água e mistura de tensoativos Kolliphor[®] EL/Plurol[®] Oleique nas proporções 1:1 (A), 2:1 (B), 3:1 (C) e 4:1 (D).....**35**
- Figura 3** – Representação esquemática de um Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT) formado por um sistema de óleo/água/tensoativos, com ênfase nas áreas de formação de micelas convencionais e microemulsão O/A (A), micelas inversa e microemulsão A/O (B), cristais líquidos (C) e microemulsão bicontínua (D).....**36**
- Figura 4** – Diagrama de Fases Pseudoternário para o sistema de óleo de alecrim, água e mistura de tensoativos Kolliphor[®] EL/ Plurol[®] Oleique na proporção 4:1 exibindo os pontos selecionados para estudo.....**38**
- Figura 5** – Aspecto visual das formulações selecionadas.....**39**
- Figura 6** – Visão pictórica do fenômeno da antipercolação.....**41**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor do EHL para cada DFPT.....	34
Tabela 2 – Composição centesimal das formulações selecionadas.....	37
Tabela 3 – Caracterização físico-química das formulações selecionadas.....	40
Tabela 4 – Avaliação da estabilidade preliminar das formulações selecionadas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- A/O** – Água em óleo
- BHA** – t-butil hidroxianisol
- DA** – Doença de Alzheimer
- DFPT** – Diagrama de Fases Pseudo-Ternário
- EHL** – Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
- F1** – Formulação 1
- F2** – Formulação 2
- F3** – Formulação 3
- HSV** – Vírus do Herpes Simples
- IR** – Índice de Refração
- ME** – Microemulsão
- MT** – Mistura de Tensoativos
- NIH** – Instituto Nacional de Saúde (dos Estados Unidos)
- O/A** – Óleo em água
- OEA** – Óleo Essencial de Alecrim
- PEC** – Parâmetro de Empacotamento Crítico
- T1** – Tensoativo 1
- T2** – Tensoativo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	16
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 <i>Características botânicas, geográficas e culturais do alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>	17
3.2 <i>O óleo essencial do alecrim (OEA)</i>	18
3.3 <i>Atividades farmacológicas do OEA</i>	19
3.3.1 <i>Composição fitoquímica</i>	21
3.4 <i>Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos</i>	23
3.5 <i>Microemulsão (ME)</i>	24
3.5.1 <i>Conceito</i>	24
3.5.2 <i>Teoria de formação das ME</i>	24
3.5.3 <i>Estrutura</i>	26
3.5.4 <i>Diagrama de Fases</i>	28
4 METODOLOGIA	30
4.1 <i>Materiais</i>	30
4.2 <i>Construção dos Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT)</i>	30
4.3 <i>Seleção das formulações</i>	30
4.4 <i>Preparação das formulações selecionadas</i>	31
4.5 <i>Caracterização dos sistemas selecionados</i>	31
4.5.1 <i>Análise macroscópica</i>	31
4.5.2 <i>Determinação do pH</i>	31
4.5.3 <i>Determinação da condutividade</i>	31
4.5.4 <i>Índice de refração</i>	32
4.5.5 <i>Avaliação da estabilidade das formulações</i>	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 <i>Escolha dos tensoativos</i>	33
5.2 <i>Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT)</i>	33
5.4 <i>Caracterização das formulações selecionadas</i>	38
5.4.1 <i>Análise macroscópica</i>	39
5.4.2 <i>Caracterização das formulações</i>	39
5.4.3 <i>Avaliação da estabilidade</i>	42
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

As maiores dificuldades enfrentadas entre os estudos pré-clínicos e clínicos de formas farmacêuticas convencionais são as barreiras anatômicas, químicas ou biológicas encontradas entre o local de administração e o local ou tecido alvo, que contrariam o efeito terapêutico esperado (OLIVEIRA et al., 2004).

Nesse sentido, a nanotecnologia aliada à tecnologia farmacêutica tem investido bastante na procura por novos sistemas de liberação de fármacos no intuito de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (CERA, 2001).

Os sistemas transportadores de fármacos são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverá exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula a ser transportada (OLIVEIRA et al., 2004). Dentre estes, muita atenção tem sido dada aos sistemas micro e nanoemulsionados, capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bem diferentes das do meio dispersante. (FORMARIZ et al., 2005).

Microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, que se formam a partir de uma aparente solubilização espontânea de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (GUIMARÃES, 2013; FANUN, 2012; LI et al., 2012; DAMASCENO et al., 2011; ROSSI et al., 2007; FORMARIZ et al., 2005;).

Sistemas microemulsionados foram descritos pioneiramente por Hoar e Schulman (1943), que produziram uma dispersão transparente, titulando uma emulsão leitosa com hexanol. No entanto, o termo “microemulsão” só foi utilizado no final da década de 1950 por Schulman et al. (1959).

Devido às suas características únicas, tais como a facilidade de preparação e de esterilização por filtração, estabilidade termodinâmica, viscosidade adequada, transparência e a capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos, a utilização de sistemas microemulsionados vem se tornando uma realidade (DAMASCENO et al., 2011), possibilitando assim, uma modificação na

biodisponibilidade e na diminuição da toxicidade dos fármacos, as quais dependendo da sua composição, podem ser aplicados, sem restrições, às vias de administração oral, ocular, parenteral, transdérmica, tópica, vaginal e retal (GUPTA & MOULIK, 2008).

Simultaneamente às pesquisas de novos sistemas de liberação de fármacos, o interesse por alternativas que diminuam os efeitos adversos e a resistência microbiana aos fármacos alopáticos existentes vem impulsionando as pesquisas com fitoterápicos (NOGUEIRA, et al., 2008). Neste cenário, destaca-se o óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn).

As principais atividades farmacológicas relacionadas ao alecrim são a atividade antioxidante e a antimicrobiana. O óleo essencial é antibacteriano e antifúngico *in vitro* (SOLIMAN et al., 1994). No entanto, apresenta algumas características que dificultam a avaliação das suas atividades biológicas, bem como podem diminuir sua eficácia terapêutica (MANJENA & MUYIMA, 1999; NAKATSU et al., 2000).

Desta forma, a nanomedicina, por ser integrativa, combina a tecnologia moderna com produtos naturais para reduzir a toxicidade e auxiliar na função imunológica (BELL et al., 2013). Assim, o desenvolvimento de uma microemulsão na qual o óleo essencial de alecrim pode atuar como princípio ativo e fase oleosa facilitará sua estabilidade, permeabilidade e absorção, podendo aumentar sua biodisponibilidade.

Além das vantagens já citadas, existe a questão econômica: o óleo de alecrim é um produto de origem natural, de fácil aquisição e baixo custo. Da mesma forma, a tecnologia empregada no desenvolvimento de ME é simples e de custo relativamente baixo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas microemulsionados contendo o óleo essencial de alecrim como fase oleosa e princípio ativo em busca de facilitar o progresso em abordagens integradoras de saúde pública para doenças infecciosas.

2.2 Objetivos Específicos

- Escolher tensoativos adequados para administração via oral e tópica das microemulsões;
- Desenvolver e utilizar diagramas de fases pseudoternários para obtenção e identificação das regiões de ME;
- Determinar o EHL dos DFPT e identificar qual o diagrama mais adequado para selecionar formulações com diferentes estruturas;
- Caracterizar os sistemas obtidos, contemplando as análises de pH, condutividade elétrica e índice de refração;
- Avaliar a estabilidade preliminar das ME, através dos ensaios de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo/degelo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características botânicas, geográficas e culturais do alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O *Rosmarinus officinalis* L., pertencente à família Lamiaceae, é um arbusto perene de porte subarborescente, pode atingir uma altura de 1,5 metros com hastes eretas, possui flores azul-esbranquiçadas de forma tubular e folhas verde-escuras lineares coriáceas com bordas viradas para trás. Sob essas bordas laminadas existem pequenas glândulas que secretam óleos aromáticos, responsáveis pelo aroma forte e agradável característico do alecrim (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2008; PORTE & GODOY, 2001; AL-SEREITI, ABU-AMER & SEN, 1999; JOLY, 1993).

É uma planta oriunda da região costeira do Mar Mediterrâneo, onde cresce em abundância, principalmente na Espanha, Itália, Grécia, Norte da África e na Dalmácia (uma região comum da Hungria e da Áustria) e eventualmente em outras regiões com até 1.500 metros de altitude, como o centro e o sul de Portugal, Ilhas Canárias, Ilha dos Açores e da Madeira. Também é nativa de regiões da Turquia, Líbano e Egito. Para seu crescimento, os terrenos rochosos e arenosos, pobres em nutrientes e climas temperados e quentes formam as condições ideais (MARCHIORI, 2004).

Seu nome “rosmarinus” significa “orvalho do mar”, fazendo alusão ao aroma abundante das praias mediterrâneas onde o alecrim crescia e se desenvolvia espontaneamente. A denominação “officinalis” demonstra que era uma planta reconhecida pela prática médico-herborista (FARIA, 2005). No Brasil, o *R. officinalis* é popularmente conhecido como alecrim, mas possui diversos sinônimos: alecrim-de-cheiro, alecrim-das-hortas, alecrim-da-casa, alecrim-comum, alecrim-verdadeiro, alecrim-de-jardim, rosmaninho, erva-das-graças, flor-de-olimpio, rosa-marinha, entre outros (MARCHIORI, 2004; PORTE & GODOY, 2001).

Suas propriedades são conhecidas desde a Grécia Antiga quando os estudantes utilizavam ramos de alecrim atrás da orelha durante as provas, pois acreditavam em seu poder de reforçar o cérebro e a memória (LOWENFELD & BACK, 1978 *apud* PORTE & GODOY, 2001). Isto se deve a um efeito estimulante do Sistema Nervoso Central provocado por um aumento do controle do organismo pelo Sistema Nervoso Simpático, resultando em uma melhoria das capacidades cognitivas de

concentração e de memória e aumentando a irrigação dos tecidos (FAIXOVÁ & FAIX, 2008).

Ocupava lugar de honra entre as plantas domésticas trazidas ao Brasil pelos primeiros colonos devido ao seu largo uso culinário, cosmético, farmacêutico e medicinal. Esta prática de utilização do alecrim para fins terapêuticos se perpetuou até os dias atuais na medicina popular, especialmente no Nordeste do Brasil, onde a planta é utilizada como analgésico, estimulante do Sistema Nervoso Central, hipertensor, diurético, antimicrobiano, antioxidante, cicatrizante, anticonvulsivante, hepatoprotetor, emenagogo, cardiotônico, broncodilatador, antifebril, béquico, colagogo, antirreumático, estimulante do couro cabeludo, para fortalecer a memória, para problemas estomacais e em doses excessivas pode ocasionar aborto (PORTE & GODOY, 2001; MARCHIORI, 2004; FARIA, 2005; DANTAS, 2007; BRITO, DANTAS & DANTAS, 2009).

Em farmácias, como outras drogas vegetais ricas em óleos voláteis, é empregado *in natura* na preparação de infusões ou de tinturas ou ainda o óleo essencial extraído com vapor d'água (MARCHIORI, 2004; FARIA, 2005; LORENZI & MATOS, 2002).

3.2 O óleo essencial do alecrim (OEA)

De modo geral, óleos essenciais são substâncias aromáticas produzidas como metabólitos secundários por grupos restritos (famílias e gêneros) de plantas (NAKATSU et al., 2000; MARCHIORI, 2004).

O óleo essencial de alecrim (OEA) especificamente trata-se de um líquido incolor ou de cor levemente amarelo-esverdeado, de odor forte característico e sabor aromático, canforáceo e amargo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Enquanto apresenta funções de atrair agentes polinizadores e de proteção à planta, o OEA é utilizado pela espécie humana nas atividades diárias bem como na indústria. É comumente usado como tempero e flavorizante de alimentos, como fragrância e incorporados em produtos cutâneos na indústria de perfumes e cosméticos devido à complexidade de seus compostos ativos, a suas intensas propriedades aromáticas e um ótimo valor de mercado. Também tem sido proposto como agente conservador natural para preparações cosméticas e alimentícias em razão de suas propriedades antimicrobianas (MANJENA & MUYIMA, 1999).

3.3 Atividades farmacológicas do OEA

O óleo essencial de alecrim tem sido prescrito topicamente para dores musculares, reumáticas e de traumas. Sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foi avaliada por Takaki et al. (2008) através de testes com camundongos e seus resultados forneceram suporte para o uso deste óleo na medicina popular para algumas doenças anti-inflamatórias e para a dor.

Outras propriedades farmacológicas foram atribuídas ao OEA. Angioni et al. (2004) comprovaram a eficácia do *Rosmarinus officinalis* em aumentar o desempenho cognitivo de seres humanos saudáveis submetidos a uma bateria de testes cognitivos computadorizados, demonstrando que o impacto olfatório causado por esse óleo essencial realça significativamente a qualidade total da memória e dos fatores de memória secundária.

Esta característica levou a estudos sobre o OEA como provável tratamento para doenças neurodegenerativas, tal como a Doença de Alzheimer (DA), causa mais comum de demência na população idosa e cujos sintomas são declínio cognitivo e deterioração mental (GOMES et al., 2009). Até agora, o único tratamento para esta doença é baseado na “hipótese colinérgica”, o que significa que as drogas aprovadas para a terapia da DA devem agir contrariando o déficit de acetilcolina, aumentando seus níveis no cérebro (HEINRICH & TEOH, 2004). Um dos prováveis mecanismos para esta atividade seria a inibição da acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina (Ach), promovendo um aumento de Ach a nível central, que está relacionada com a memória. Mata et al. (2007) avaliou a atividade inibitória de acetilcolinesterase do óleo essencial, do extrato aquoso e etanólico de *R. officinalis* e de outras plantas, o óleo de alecrim obteve o melhor resultado ($IC_{50} = 69.8 \pm 0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Foi avaliado em modelo animal que o óleo essencial de alecrim possui efeito agonista nos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 mesmo em pequenas doses. Em doses acima de 25 $\mu\text{l/l}$ do óleo de alecrim, o efeito espasmolítico descrito em outros trabalhos foi detectado (SAGORCHEV, LUKANOV & BEER, 2010). Essa ação agonista provoca uma resposta simpática do organismo, o que justifica muitas das atividades atribuídas ao óleo, como a aceleração dos batimentos cardíacos, aumento da pressão arterial, o aumento da adrenalina e da concentração de açúcar no sangue, a dilatação dos brônquios e a ativação do metabolismo geral do corpo (AL-SEREITI, ABU-AMER & SEN, 1999).

Na constante procura por substâncias com atividade antiviral, Vijayan et al. (2004) pesquisaram várias plantas de diferentes famílias selecionando aquelas com histórico etnomedicinal. Dentre elas foi estudado o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, que demonstrou, em concentração elevada, atividade parcial contra o vírus do herpes simples (HSV).

Entretanto, em meio a tantas possibilidades de uso terapêutico, há um número bem maior de pesquisas envolvendo o estudo das propriedades antioxidativas e antimicrobianas desse óleo. Embora a maior parte da ação antioxidativa do alecrim tenha sido atribuída aos extratos aquoso e alcoólico da planta, Stahenko et al. (2002) determinaram, *in vitro*, a atividade antioxidante do óleo essencial obtido, que se mostrou superior à atividade da vitamina E, do Trolox[®] e do BHA (t-butil hidroxianisol).

Existem várias pesquisas na literatura científica sobre a atividade antibacteriana do óleo de alecrim contra patógenos de origem alimentar. A maior parte dos trabalhos demonstrou que o óleo possuía maior atividade contra bactérias Gram-positivas, como as *Salmonellas*, *Shigellas* e *Staphylococci* (MANJENA & MUYIMA, 1999). Porte & Godoy (2001) não encontraram nenhuma atividade do óleo contra cepas de *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto Packer & Luz (2007) comprovaram atividade bacteriostática dos óleos de alecrim e melaleuca contra essas duas espécies, além de *Staphylococcus aureus*.

Na busca de alternativas para o tratamento de infecções do trato urinário, Petrolini et al. (2013) cita os trabalhos de Bozin et al. (2007), que identificou a sensibilidade de *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* ao óleo essencial de alecrim, bem como Fu et al. (2007) encontrou sensibilidade para as espécies já citadas e ainda para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas vulgaris* e *Bacillus subtilis*.

A atividade antifúngica deste óleo mostrou-se bastante promissora, especialmente contra *Candida albicans*, mostrando ser mais eficiente que quando comparada à sua ação antibacteriana (PACKER & LUZ, 2007). Possui uso potencial em tratamentos de meningite e pneumonia causadas por *Cryptococcus neoformans*, bem como infecções cutâneas e diarreia por *C. albicans* e infecções sistêmicas por *Mycobacterium intracellulare* em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (PORTE & GODOY, 2001).

Nascimento e colaboradores (2000) relataram a ação antimicrobiana de extratos de alecrim frente a bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos sintéticos,

verificando sinergismo entre antibióticos e os extratos usados, possibilitando que antibióticos ineficazes apresentassem ação sobre bactérias resistentes. Diversos autores ainda citam seu uso em sinergismo com antibióticos tradicionais potencializando sua ação antimicrobiana (PROBST, 2012; RIBEIRO et al., 2012; JARRAR, ABU-HIJLEH & ADWAN, 2010; ZAGO et al., 2009).

Hussain et al. (2010) evidenciaram atividade antiproliferativa do óleo essencial de *R. officinalis* do Paquistão contra células de câncer de mama (MCF-7), câncer de próstata (LNCaP) e células fibroblásticas (NIH-3T3), bem como atividade antioxidante e antibacteriana, demonstrando, entretanto, uma ação mais efetiva do óleo para bactérias Gram-positivas. Geralmente, óleos essenciais são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Há uma hipótese de que a presença de lipopolissacarídeo na parede celular englobando a camada de peptidoglicano bacteriano restringe a difusão de compostos hidrofóbicos no citoplasma (YAP et al., 2014).

Essa característica hidrofóbica, além de ser a possível causa da baixa eficácia contra bactérias Gram-negativas, também é um dos fatores que dificultam a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, pois não difundem facilmente em meio aquoso. Além disso, são voláteis à temperatura ambiente e possuem uma complexa composição, portanto, a prevalência de falsos negativos ou resultados de atividade reduzida devem ser esperados (MANJENA & MUYIMA, 1999; NAKATSU et al., 2000).

Vários estudos foram realizados no sentido de avaliar a correlação entre a composição química do óleo de alecrim e a sua atividade biológica (JORDÁN et al., 2013; JIANG et al., 2011; SZUMNY et al., 2010; FAIXOVÁ & FAIX, 2008; NAKATSU et al., 2000). As propriedades antimicrobianas parecem estar relacionadas com a presença de borneol, cineol, pinenos e cânfora (PORTE & GODOY, 2001), porém o efeito antimicrobiano do OEA pode não ser devido à presença de uma única substância em grande quantidade, mas sim, ao efeito sinérgico de diversas substâncias em pequenas quantidades (OUATTARA et al., 1997).

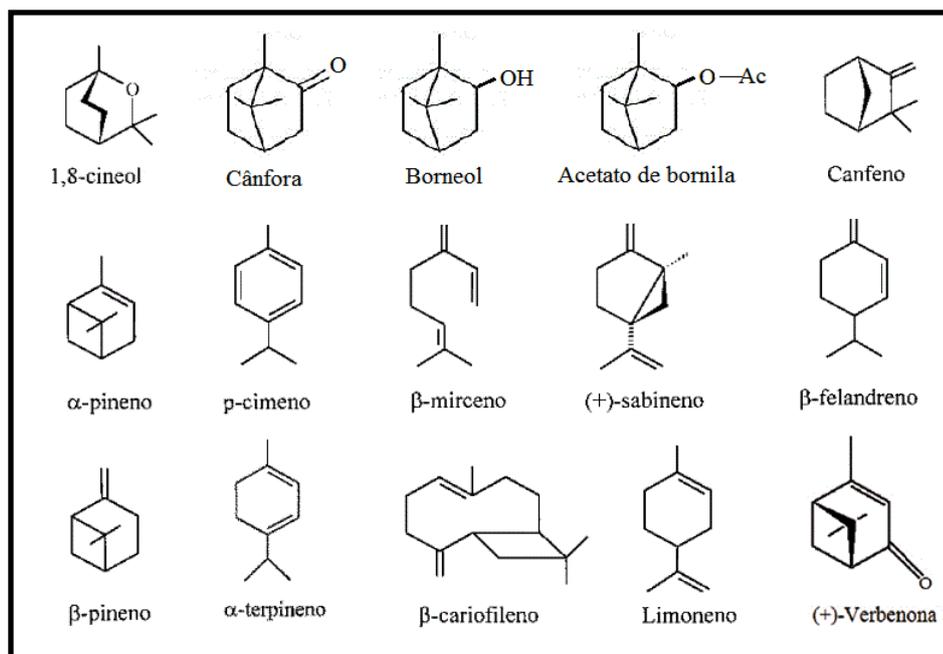
3.3.1 Composição fitoquímica

O óleo essencial de alecrim contém vários compostos em diferentes concentrações. Caracteriza-se por dois ou três compostos majoritários em

concentrações relativamente elevadas (20-70%) em comparação com outros compostos presentes em quantidades vestigiais (FAIXOVÁ & FAIX, 2008).

De modo geral, existe acordo de que os monoterpenos são majoritários. Entretanto, ainda há discrepância entre as principais substâncias, ora são hidrocarbonetos, como pinenos, mirceno, canfeno e ora são oxigenadas, como cânfora, 1,8-cineol e borneol (Figura 1). No entanto, diferentes cultivares de alecrim e diversas origens genéticas associadas aos aspectos ambientais de crescimento particulares de cada região, ao tempo de colheita e o tipo de destilação influenciam a composição química e o rendimento dos óleos essenciais produzidos (PORTE & GODOY, 2001).

Figura 1- Principais compostos terpênicos encontrados no óleo essencial de alecrim



(FONTE: www.3dchem.com).

Alguns componentes emprestam certas características específicas ao óleo essencial de alecrim, tais como: 1,8-cineol – aroma refrescante; α -pineno – aroma de pinho; cânfora – aroma e sabor mentolado; borneol – gosto acre (SVOBODA & DEANS, 1992). Determinar a composição química do óleo essencial é importante para aproveitar suas potencialidades e valorizá-lo comercialmente. Por exemplo, o óleo rico em cânfora pode constituir bom agente antimicrobiano em alimentos, um óleo rico em 1,8-cineol ou α -pineno pode ser preferido para uso terapêutico (PORTE

& GODOY, 2001). Além disto, a presença majoritária de compostos terpênicos em seus constituintes auxiliam como promotores de permeação (DAS, BHATTACHARYA, GHOSAL, 2006), facilitando sua incorporação em sistemas microemulsionados.

3.4 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármacos

A nanotecnologia corresponde à metodologia de processamento envolvendo a manipulação atômica, molecular e macromolecular visando à criação de materiais, dispositivos ou sistemas com propriedades e aplicações inovadoras e que estejam em escala nanométrica ($10^{-9}\text{m} = 1\text{nm}$), com comprimentos típicos que não excedam 100 nm. Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (FERREIRA & RANGEL, 2009).

O campo da nanotecnologia está atualmente em fase de desenvolvimento explosivo em várias áreas do conhecimento, movimentando bilhões de dólares em investimento no mundo. Dentre essas áreas, uma com grande importância é a nanomedicina, que, de acordo com o *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde - NIH), dos Estados Unidos, se refere às intervenções médicas altamente específicas em escala molecular para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (PARK, 2007; SAHOO & LABHASETWAR, 2003).

Neste aspecto, nanossistemas de carreamento e liberação de fármacos constituem uma porção significativa da nanomedicina, além de que a eficácia e utilidade desses sistemas não se restringe ao seu tamanho reduzido (PARK, 2007). O conceito desse tipo de sistemas de liberação emergiu na tentativa de minimizar os efeitos adversos dos fármacos, alargar suas aplicações, expandir as formas de administração e solucionar problemas de absorção (GUPTA & MOULIK, 2007). Essas propriedades são alcançadas em virtude de um significativo aumento na solubilidade aparente dos fármacos (sobretudo aqueles pertencentes às classes biofarmacêuticas de baixa solubilidade), melhorando sua dissolução e biodisponibilidade; possibilitando inclusive a sua utilização como sistemas que controlam a liberação de fármacos através de uma cinética específica, portanto, melhorando a sua ação terapêutica (GUIMARÃES, 2013; SILVA et al., 2009a; ASTIER et al., 2006; TENJARLA, 1999).

3.5 Microemulsão (ME)

3.5.1 Conceito

Em 1943, Hoar e Schulman relataram a formação espontânea de uma solução transparente e estável após a mistura de óleo, água e um tensoativo iônico combinado com um cotensoativo (um álcool graxo de cadeia média) representando a primeira descrição científica do que anos depois (1959) foi denominado por Schulman et al. como “microemulsão” (ME), definido como “microdispersões líquidas contendo água, óleo e substâncias anfifílicas (tensoativos) e que sejam opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis” (SOLANS & KUNIEDA, 1997). No entanto, essa definição é limitada, uma vez que a mistura de óleo, água e tensoativos pode levar à formação de uma grande variedade de estruturas e fases (TALEGAONKAR et al., 2008; NAOUI et al, 2011).

Nesse contexto, o aperfeiçoamento dos estudos com microemulsões conduziu a algumas modificações e dentre os conceitos mais recentes, encontra-se que “as ME se formam a partir de uma aparente solubilização espontânea de dois líquidos imiscíveis na presença de um tensoativo e, se necessário, um cotensoativo; sendo caracteristicamente sistemas dispersos (microgotículas dispersas), termodinamicamente estáveis, transparentes ou translúcidos, com baixíssima tensão interfacial”. Atualmente, o termo microemulsão vem sendo utilizado para designar sistemas de fases microeterogêneas que podem apresentar de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (FANUN, 2012; DAMASCENO et al., 2011; ROSSI et al., 2007; FORMARIZ et. al, 2005; OLIVEIRA et al., 2004; TENJARLA, 1999).

3.5.2 Teoria de formação das ME

Ao misturar dois líquidos imiscíveis, sob agitação constante, as duas fases tendem, inicialmente a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro. Quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente. Se um tensoativo for adicionado ao sistema, diminui-se a tensão interfacial entre as fases, com papel fundamental na estabilidade de emulsões e microemulsões. No entanto, as MEs diferem das emulsões não somente por serem opticamente transparentes, mas, essencialmente, pela maior estabilidade termodinâmica (OLIVEIRA et al., 2004)

Para elucidar melhor o processo de formação das ME, Tenjarla (1999) sugere três teorias: teoria da solubilização, teoria da tensão interfacial e teoria termodinâmica.

A teoria da solubilização é a mais simples e diz que a formação das ME se dá através de um intumescimento de micelas, no qual a água é solubilizada no interior das micelas reversas ou o óleo é solubilizado em micelas regulares (DAMASCENO et al., 2011).

Uma tensão interfacial (γ_i) muito baixa é um pré-requisito para a formação das MEs. A teoria da tensão interfacial propõe que, à medida que o número de moléculas de tensoativo aumenta por unidade de área na interface óleo/água elas começam a se comprimirem, umas ao lado das outras, desenvolvendo uma pressão lateral bidimensional (π). Desse modo, a tensão de superfície (γ_i) na interface diminui proporcionalmente com o aumento dessa pressão e com a diminuição da tensão original entre o óleo e a água ($\gamma_{O/A}$), causada após o potencial químico do(s) tensoativo(s) em cada fase ter sido equalizado por partição ($\gamma_{O/A} \rightarrow (\gamma_{O/A})_a$). Esse fenômeno pode ser expresso pela Equação 1:

$$\gamma_i = (\gamma_{O/A})_a - \pi \quad (1)$$

Assim, quando a repulsão entre as espécies do filme interfacial (π) for menor que a tensão original O/A, torna-se viável a expansão espontânea da interface e orientação da força que reduz o tamanho das gotículas até não haver mais necessidade de energia para aumentar a área interfacial. O equilíbrio é atingido quando a tensão negativa volta a se aproximar de zero, em virtude da descompressão das moléculas com conseqüente redução da pressão na interface, favorecendo, assim, a dispersão de uma fase na outra. Esse resultado indica que os tensoativos de caráter muito hidrofílicos ou lipofílicos são inapropriados para a formulação de MEs, mesmo com ajuda de cotensoativos, pois mesmo com a adição desses compostos, a tensão interfacial não diminuirá suficientemente para a formação de um sistema microemulsionado (DAMASCENO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004).

A terceira teoria baseia-se na lei da termodinâmica que diz que a energia livre de Gibbs (G) deve se tornar negativa para a formação de uma ME

termodinamicamente estável. A energia livre de superfície pode ser definida pela Equação 2 à temperatura, volume e número de moles constante:

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma_i \times \Delta S \quad (2)$$

Onde ΔS representa a variação na área interfacial ($S_2 - S_1$). No entanto, o processo de emulsificação implica em um grande aumento da área interfacial ($S_1 \rightarrow S_2$), o que leva a um aumento brusco da energia livre de superfície. Pode-se verificar que o caminho mais viável para estabilização do sistema é a diminuição da tensão interfacial (γ_i) da dispersão, como forma de reduzir a energia livre derivada da expansão da área interfacial (OLIVEIRA et al., 2005). A estabilidade do sistema deverá ser maior quando o aumento da energia livre for totalmente compensado pela diminuição da tensão interfacial. Portanto, pela tendência da γ_i de se aproximar de zero, a variação de energia livre também vai tender a zero ($\Delta G \rightarrow 0$) segundo as Equações 1 e 2 e, conseqüentemente, o sistema vai ser estável termodinamicamente. Se a γ_i for negativa, ΔG vai ser menor que zero e a microemulsificação será espontânea (DAMASCENO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2005).

3.5.3 Estrutura

As ME podem ser classificadas quanto a sua estrutura em três tipos: água em óleo (A/O); óleo em água (O/A); e bicontínua. Embora a formação de uma estrutura de micela intumescida (de água ou óleo) regular (O/A) ou reversa (A/O) apenas é possível em ME muito diluídas (DAMASCENO et al, 2011).

As ME do tipo O/A (regular) se caracterizam pela existência de uma fase interna, dispersa ou descontínua composta pela fase oleosa em um meio dispersante, fase externa ou contínua constituída pela fase aquosa. De modo semelhante, as ME do tipo A/O (reversa) possuem a fase interna hidrofílica e a fase externa lipofílica. Ambas as estruturas de gotículas O/A ou A/O são revestidas por um filme interfacial misto de tensoativo e cotensoativo (quando presentes) arranjados alternadamente, cujas frações apolares encontram-se voltadas para a fase oleosa (apolar) enquanto as porções polares fazem fronteira com o componente aquoso (polar) da ME (MCCLEMENTS, 2012).

No entanto, as microemulsões são sistemas dinâmicos cuja interface encontra-se contínua e espontaneamente flutuante (ZHANG & MICHNIAK-KOHN, 2011; TALEGAONKAR et al, 2008). Dessa forma, podemos encontrar ainda a formação de uma estrutura não esférica, com canais adjacentes alongados como uma rede de tubos em determinada polaridade em matriz de polaridade oposta, denominada bicontínua, que pode ocorrer através de dois mecanismos: 1) na transição de um sistema O/A para A/O ou o inverso; 2) quando os volumes utilizados das duas fases é muito próximo (GUIMARÃES, 2013; DAMASCENO et al, 2011; TALEGAONKAR et al., 2008; FORMARIZ et al, 2005).

A estrutura do sistema formado será influenciada pelas propriedades físico-químicas e a proporção dos componentes utilizados na formulação (FANUN, 2012) que, além das microemulsões podem formar ainda nanoemulsões (emulsões com gotículas de tamanho reduzido, mas termodinamicamente instáveis) e se uma grande quantidade de tensoativos estiver presente, o sistema pode formar estruturas anisotrópicas como os cristais líquidos lamelares, fases hexagonais ou fases cúbicas conforme o aumento da concentração de tensoativos (MCCLEMENTS, 2012; TALEGAONKAR, 2008; FORMARIZ et al., 2005; TENJARLA, 1999).

Mitchell e Ninham (1981) propuseram o parâmetro de empacotamento crítico (PEC), utilizado para prever a geometria preferencialmente formada por um composto anfifílico devido à sua tendência de formar micelas ou micelas reversas e pode ser representado pela Equação 3:

$$PEC = \frac{V}{a \times l} \quad (3)$$

Em que V , a e l representam o volume molar parcial da parte hidrofóbica, a área da cabeça polar e o comprimento da cauda hidrofóbica do tensoativo, respectivamente. Quando o PEC está entre zero e um, microemulsões do tipo O/A são formadas. O inverso ocorre quando o PEC é maior do que um, formando microemulsões do tipo A/O. Quando o PEC está próximo de um, a ME formada é do tipo bicontínua (LAWRENCE & REES, 2000; TENJARLA, 1999).

Entretanto, a possibilidade de formar MEs depende ainda do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força

iônica e a presença de cotensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) adequado proporciona a condição máxima de “solubilização” do óleo e da água (MITTAL, 1999). O EHL é uma escala semi-arbitrária, proposta por Griffin (1949) para quantificar os efeitos das contribuições das partes polares e apolares existentes na estrutura dos tensoativos. Em geral, tensoativos com EHL entre 3 e 8 favorecem a formação de ME A/O enquanto ME O/A são facilitados por tensoativos com EHL entre 8 e 18 (LAWRENCE & REES, 2000; TENJARLA, 1999).

Quando um sistema microemulsionado é formado os tensoativos combinados (em uma determinada proporção) produzem um filme adsorvido entre as fases aquosa e oleosa responsável pela redução (para valores minimizados) da tensão interfacial provocando uma otimização da estabilidade termodinâmica. Em geral, as ME possuem um tamanho de gotícula entre 10 e 300 nm e são opticamente límpidas uma vez que o diâmetro médio das gotículas representa menos que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente, portanto a luz não sofre dispersão e o sistema apresenta-se transparente (GUIMARÃES, 2013; ALTHANYAN, 2011; DAMASCENO, 2011; ROSSI, 2007).

3.5.4 Diagrama de Fases

A relação entre a composição, o aspecto e o número de fases apresentadas por determinada mistura pode ser capturada com a ajuda de um diagrama de fases (LAWRENCE & REES, 2000). Sua interpretação descreve as estruturas contidas nele, possibilitando a escolha da região cujo aspecto e constituição sejam mais favoráveis à incorporação de um fármaco (GUIMARÃES, 2013).

O sistema de equilíbrio das fases em preparações contendo três componentes são representados classicamente por um Diagrama de Fases Ternário, em que cada vértice do triângulo representa 100% de um componente em particular. As propriedades dos triângulos equiláteros devem ser extremamente exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de determinado ponto no diagrama é igual a sua altura (SILVA et al., 2009b).

Usualmente, as ME são compostas por quatro componentes (água, óleo, tensoativo e cotensoativo) tornando-se mais adequada a utilização de Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT). O que difere um DFPT de um Diagrama Ternário convencional é o fato de que no primeiro o cotensoativo e o tensoativo são agrupados como um único componente, desde que a razão entre as massas destes

dois elementos seja constante em todos os pontos do diagrama (GUIMARÃES, 2013).

Os diagramas são construídos em duas dimensões a partir de dados obtidos por titulação ou pela preparação de um amplo número de amostras de diferentes composições. A vantagem do primeiro método é a possibilidade de analisar um grande número de preparações de forma mais rápida, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (DAMASCENO, 2011).

Essa ferramenta facilita a escolha da formulação mais apropriada para se incorporar determinado fármaco, pois é possível delimitar regiões no diagrama de fases apenas com a inspeção visual das amostras, já que se apresentam comumente como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, sistemas de viscosidade elevada, separação de fases ou como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (característica dos sistemas microemulsionados) (GUIMARÃES, 2013; FORMARIZ et al., 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

- Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido por hidrodestilação na cidade de Eusébio - CE, Brasil pela indústria União Vegetal e adquirido comercialmente para realização da pesquisa.
- Água deionizada.
- Kolliphor[®] EL, Cremophor[®] EL, (Macrogolglycerol ricinoleate, PEG-35 castor oil, Polyoxyl 35 hydrogenated castor oil, Polyoxyl-35 castor oil) – Sigma Aldrich;
- Plurol[®] Oleique (polyglyceryl-6 dioleate) – Gattefossé.

4.2 Construção dos Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT)

Os DFPT foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes Kolliphor[®] EL (T1) com Plurol[®] Oleique (T2) nas proporções 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1 e, a esta mistura de tensoativos (MT), foi adicionado o OEA nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com volumes pré-definidos de água deionizada, adicionando gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação a mistura foi homogeneizada em um Desruptor de célula ultrassônico/sonda de ultrassom (DES500, Unique, Brasil), por 1 minuto, potência de 250W. Após cada sonicação, a mistura foi levada ao banho de ultrassom (USC-1800, Unique, Brasil) por 1 minuto, para uma melhor homogeneização e retirada das bolhas quando presentes, facilitando assim a visualização dos sistemas formados contra um fundo preto. Para cada titulação foram feitos 3 ciclos (sonicador/banho de ultrassom). Considerando-se as proporções dos componentes (MT; fase oleosa e fase aquosa) após as titulações aquosas plotou-se os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente ou translúcido líquido ou de ME para sistema opaco líquido ou semi-sólido (emulsão); líquido leitoso ou ainda separação de fases em cada diagrama. Os diagramas foram plotados utilizando-se o software Origin Pro[®] 8.0.

4.3 Seleção das formulações

Dos quatro diagramas formados, foi selecionado o que apresentou maior área de sistemas transparentes e, deste diagrama, foram selecionadas três formulações

para serem caracterizadas. Para seleção das formulações foi levado em conta a região onde se localizavam no diagrama e a provável estrutura formada.

4.4 Preparação das formulações selecionadas

Foram preparados 15ml de cada formulação selecionada através da pesagem dos componentes em suas percentagens já fornecidas pelo OriginPro[®] 8.0 e, na sequência, foram submetidas a três ciclos de homogeneização no desruptor de célula ultrassônico/sonda de ultrassom (DES500, Unique, Brasil) por 1 minuto, potência 250W, seguidos de banho de ultrassom (USC-1800, Unique, Brasil) por mais 1 minuto. Após a preparação foram deixadas em repouso por 48h até a realização da caracterização.

4.5 Caracterização dos sistemas selecionados

4.5.1 Análise macroscópica

Aspectos como coloração, homogeneidade das microemulsões, separação de fases ou presença de precipitados foram avaliados decorridas 48 horas após a obtenção de cada formulação. As amostras foram armazenadas em frascos de cintilação à temperatura ambiente (25 °C).

4.5.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado em pHmetro digital (Instrutemp, ITmPA 210, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 à uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. As determinações dos valores de pH foram obtidas em triplicata.

4.5.3 Determinação da condutividade

A condutividade elétrica das formulações obtidas foi determinada em condutímetro digital (Instrutemp, MCA 210, Brasil). O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, à temperatura de 25 °C. As determinações dos valores de condutividade foram obtidas com introdução do eletrodo diretamente no interior das formulações acondicionadas em frasco de cintilação. A análise foi feita em triplicata.

4.5.4 Índice de refração

Para o índice de refração foi utilizado refratômetro de bancada ABBE (Biobrix, São Paulo, Brasil), conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). O equipamento foi aferido com água deionizada ($IR = 1,333$), à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. A análise foi feita em triplicata.

4.5.5 Avaliação da estabilidade das formulações

A estabilidade das amostras foi avaliada quanto aos ensaios de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo/degelo.

4.5.5.1 Centrifugação

Foi retirada uma alíquota de 1g de cada formulação e após colocadas em *eppendorfs* foram submetidas a centrifugação em microcentrífuga (Nova Instruments, NI 1801, Brasil) a 13000 rpm (7985 g) por 30 min e por 1 hora. As amostras foram classificadas como estáveis, levemente modificadas e separação de fases.

4.5.5.2 Estresse térmico

Foram pesados 2g de cada formulação, que foram submetidas a um aquecimento de 40°C a 80°C, com aumento gradual de temperatura de 5 graus centígrados a cada 30 min. Foi utilizado um banho de ultrassom com aquecimento (USC-1800, Unique, Brasil).

4.5.5.3 Ciclo Gelo/Degelo

O ciclo gelo-degelo foi realizado submetendo-se as amostras a um total de 6 ciclos de resfriamento e aquecimento como forma de avaliar se os limites extremos de frio e calor serão capazes de desestabilizar estes sistemas. Cada ciclo consistiu de 24 horas a 8°C na geladeira seguido por 24 horas a 45°C na estufa durante 12 dias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha dos tensoativos

Os tensoativos não-iônicos mostram vantagens particulares devido a baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade, elevada estabilidade química e por promoverem uma grande permeabilidade do fármaco pela pele, por isso são preferíveis para desenvolvimento de formulações de aplicação tópica (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR & MALLYA, 2011; TENJARLA, 1999). São considerados aceitáveis para ingestão por via oral e o aparecimento emergente de vários produtos comercializados com sucesso tem dado confiança às indústrias farmacêuticas e cosméticas para utilização deste tipo de surfactante (POUTON & PORTER, 2008). Apresentam também maior grau de compatibilidade com diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos catiônicos e aniônicos e são menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (BILLANY, 2005).

O EHL do óleo também tem influência direta sobre a escolha de tensoativos, pois conforme Schmidts e cols. (2010), as ME são melhores formuladas quando o valor de EHL do óleo está próximo ao EHL da mistura de tensoativos.

Os números correspondentes ao EHL de alguns produtos são frequentemente indicados na literatura como “valores compreendidos em uma faixa entre dois pontos”, muitas vezes não próximos, como para a família dos óleos de origem vegetal em que a referência de EHL fica compreendida entre 6 e 12. Esta situação dificulta de maneira significativa a elaboração de sistemas emulsionados estáveis (ZANIN et al., 2002).

Na literatura foi encontrado que o valor de EHL para o óleo essencial de alecrim encontra-se na faixa de 12 a 14 (GILLILAN, 2012). Desta forma, foi determinada a escolha de dois tensoativos não-iônicos que poderiam ser utilizados tanto por via oral como por via tópica e transdérmica: um com caráter hidrofílico, Kolliphor[®] EL (EHL 14-16) e outro lipofílico, Plurol[®] Oleique (EHL 6), de forma que a mistura desses tensoativos em diferentes proporções gerasse o EHL mais próximo da fase oleosa.

5.2 Diagramas de Fases Pseudoternários (DFPT)

Definidos os componentes da formulação, foram determinadas as melhores proporções de MT para construção dos DFPT a fim de se obter o máximo de equilíbrio do sistema levando a formação de áreas mais extensas de ME nos

diagramas. Para sistemas emulsionados com a fase externa aquosa é essencial um valor de EHL entre 8 e 14. Valores maiores ou menores induzirão a solubilização dos tensoativos na água ou no óleo, respectivamente (MACEDO et al., 2006).

Segundo a teoria de Griffin (1954), para determinação do EHL de um sistema emulsionado são levados em consideração os valores de EHL de cada tensoativo e suas respectivas porcentagens em massa no sistema através da Equação 4:

$$EHL_{sistema} = \frac{(EHL_{Tensoativo A} \times \%Tensoativo A) + (EHL_{Tensoativo B} \times \%Tensoativo B)}{100} \quad (4)$$

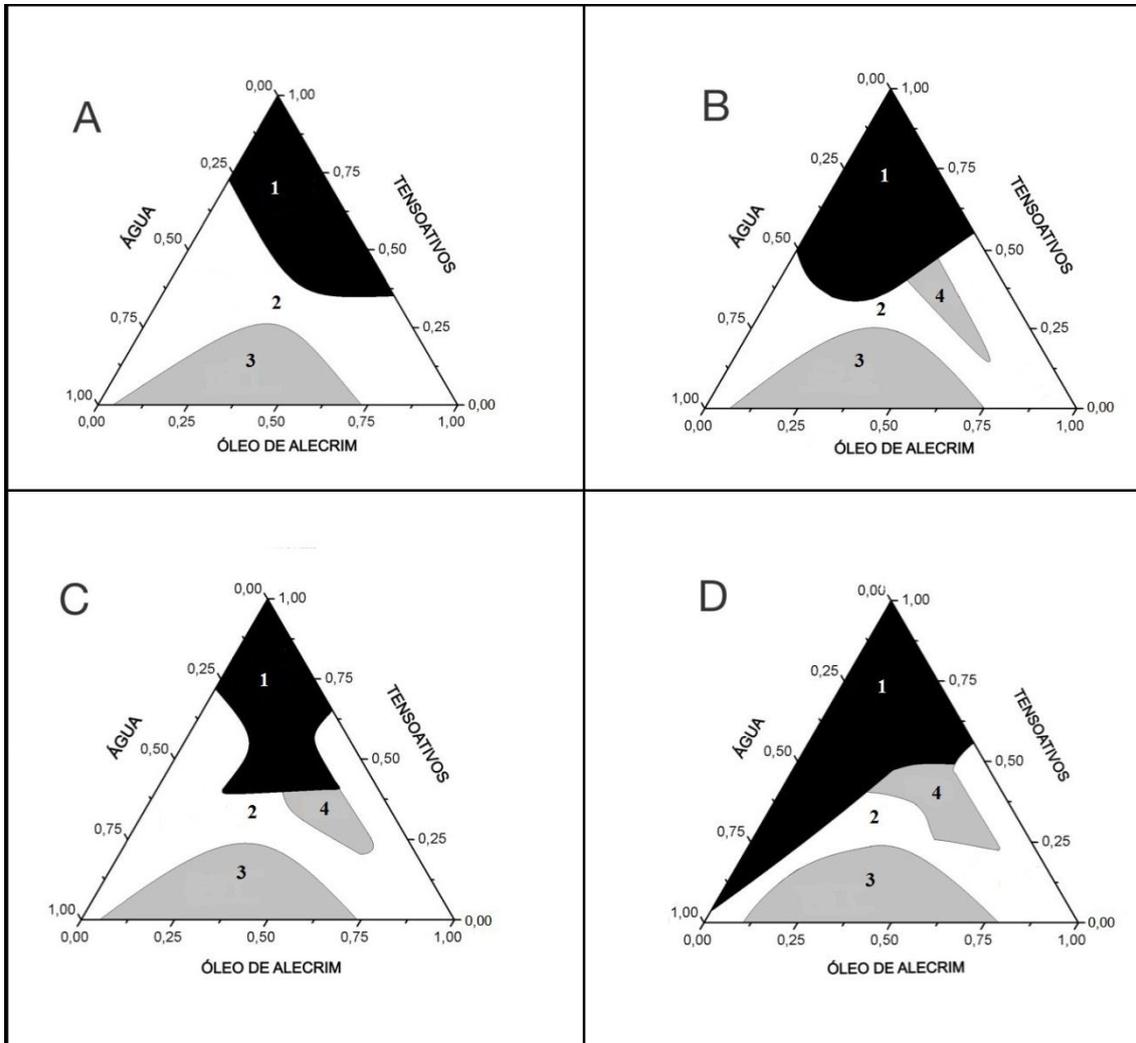
Conforme o que foi discutido, foram escolhidas as proporções de MT 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 e foram calculados o EHL dos sistemas de cada diagrama como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Valor do EHL para cada DFPT

Proporção da MT (Kolliphor[®] EL/Plurol[®] oleique)	EHL
1:1	10 - 11
2:1	11,33 - 12,66
3:1	12 - 13,5
4:1	12,4 - 14

Para construção dos DFPT utilizou-se a metodologia de titulação, bastante simples e reprodutível. Os DFPT exibiram diferentes comportamentos de fase das misturas dos componentes, como representado na Figura 2. Pôde-se observar que em nenhum dos diagramas houve separação de fases. As emulsões formadas foram classificadas de acordo com seu aspecto físico, porém o objeto de interesse desse estudo foram formulações cuja energia empregada e as proporções de seus componentes foram capazes de reduzir a tensão interfacial a ponto de formar um sistema homogêneo, límpido e translúcido, característico de microemulsão (SILVA et al, 2009a). Essas formulações estão representadas na Figura 2 como regiões de ME (1).

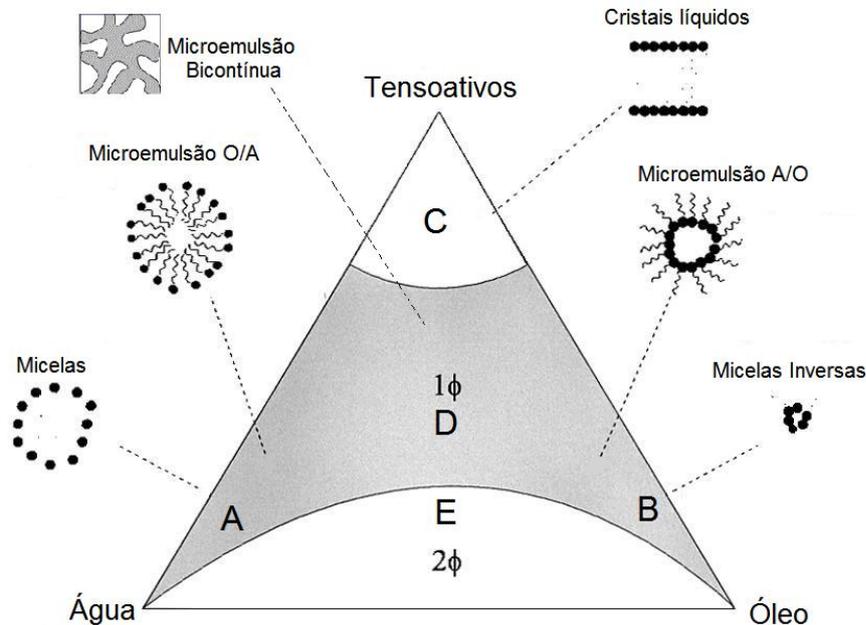
Figura 2 - Diagramas de Fase Pseudoternários para o sistema de óleo de alecrim, água e mistura de tensoativos Kolliphor EL[®]/Plurol oleique[®] nas proporções 1:1 (A), 2:1 (B), 3:1 (C) e 4:1 (D).



Legenda: 1 – Sistemas Transparentes (Região de microemulsão); 2 – Emulsão Líquida Opaca; 3 – Emulsão Líquida Leitosa; 4 – Emulsão Semissólida (FONTE: Dados da pesquisa).

Além do número de fases, aspecto visual e composição centesimal de cada ponto, características microestruturais também podem ser investigadas através da visualização do DFPT (LAWRENCE & REES, 2000). De modo geral, a Figura 3 descreve as condições experimentais da existência dos diferentes tipos de estruturas.

Figura 3 - Representação esquemática de um Diagrama de Fases Pseudoternário (DFPT) formado por um sistema de óleo/água/tenssoativos, com ênfase nas áreas de formação de micelas convencionais e microemulsão O/A (**A**), micelas inversas e microemulsão A/O (**B**), cristais líquidos (**C**) e microemulsão bicontínua (**D**).



(FONTE: Lawrence & Rees, 2000. Imagem editada).

Na região denominada A existe predomínio de fase aquosa e a concentração relativa de tensoativo é pequena. Representativa de ME O/A. Numa diluição infinita com fase aquosa o sistema tende à formação de micelas mistas da mistura emulsiva, contendo a fase oleosa dissolvida em seu interior hidrofóbico. O volume de fase interna é pequeno, definido pela Equação 5:

$$\phi = 1 - (\omega \cdot \delta) \quad (5)$$

Na qual ω é a relação entre a massa de fase aquosa e a massa total de microemulsão e δ é a relação entre as densidades da microemulsão e da fase aquosa (OLIVEIRA et al., 2004).

Na região B predomina a fase oleosa, é pobre em fase aquosa e mistura emulsiva. Representativa de ME A/O. Numa diluição infinita tende a formar micelas reversas, compostas por grande parte de fase externa oleosa, com fase aquosa dissolvida nas micelas inversas. O volume de fase interna da ME é pequeno (OLIVEIRA et al., 2004).

A região C é rica em mistura emulsiva, contém muito pouca fase aquosa e fase oleosa. A estrutura que melhor representa essa região consiste de uma fase contínua onde a mistura de tensoativos, óleo e água encontram-se em fase lamelar, na qual os tensoativos organizam-se na interface contínua óleo/água separando ambas as fases (OLIVEIRA et al., 2004).

A região D é intermediária entre as regiões A e B que possuem estruturas bem definidas. A microestrutura do sistema corresponde a fases bicontínuas, as quais podem explicar a passagem gradual de um sistema O/A para A/O (OLIVEIRA et al., 2004).

A região E corresponde à região onde o sistema é muito instável e ocorre separação entre as fases aquosa e oleosa (OLIVEIRA et al., 2004).

Dessa forma, o DFPT 4:1 (Diagrama D – Figura 2), de EHL mais próximo ao encontrado para o óleo, foi escolhido para seleção das formulações, pois apresentou maior área de formação de ME com maior diversidade de estruturas, principalmente dos tipos O/A e bicontínua, que caracterizam formulações mais adequadas para carrear o óleo essencial de alecrim.

5.3 Seleção das formulações

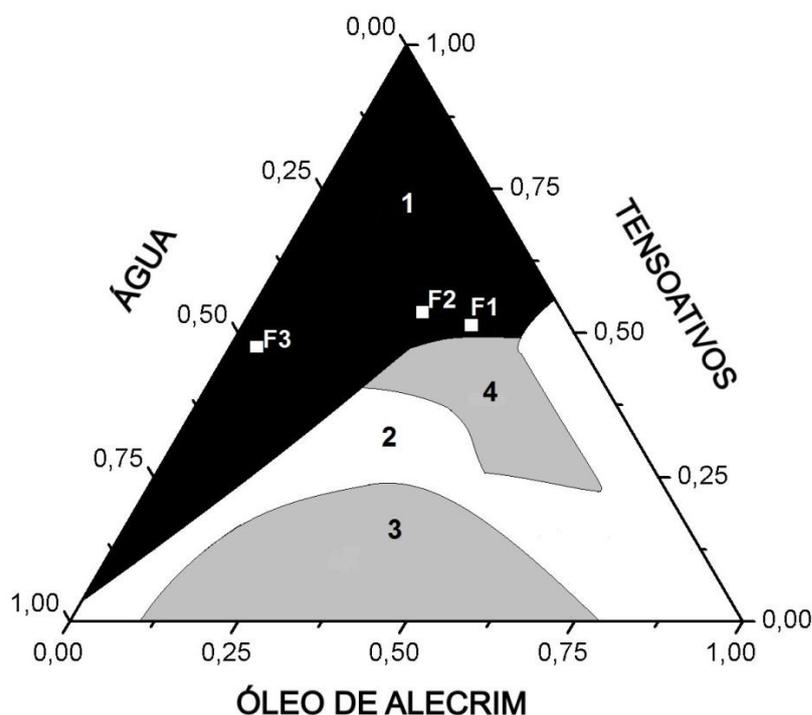
Do diagrama de fases escolhido, foram selecionadas três formulações para realização dos estudos de caracterização de acordo com as características visuais bem como da estrutura esperada conforme o local do diagrama em que se encontravam. Dessa forma, foram escolhidas as formulações F1 e F2 por serem prováveis ME bicontínuas. Já a F3 foi escolhida por encontrar-se em uma região característica de ME O/A. A composição de cada formulação está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição centesimal das formulações selecionadas.

Componente	Função	F1(%)	F2(%)	F3(%)
Kolliphor® EL	Tensoativo 1	40,6	43,0	38,1
Plurol® Oleique	Tensoativo 2	10,2	10,8	9,5
Óleo essencial de alecrim	Fase oleosa	33,9	23,1	5,3
Água	Fase aquosa	15,3	23,1	47,1

O cuidado em não escolher formulações muito próximas à interface das áreas é importante para não arriscar a escolha de uma composição cujo comportamento de fases esteja em transição, mas como o intuito do estudo era avaliar diferentes estruturas de ME, não foi possível evitar essa proximidade para as formulações F1 e F2 (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama de Fases Pseudoternário para o sistema de óleo de alecrim, água e mistura de tensoativos Kolliphor EL[®]/ Plurol oleique[®] na proporção 4:1 exibindo os pontos selecionados para estudo.



Legenda: 1 – Região de sistemas transparentes; 2 – Região de emulsões líquidas opacas; 3 – Região de emulsões leitosas; 4 – Região de emulsões semissólidas; F1 – Formulação 1; F2 – Formulação 2; F3 – Formulação 3 (FONTE: Dados da pesquisa).

5.4 Caracterização das formulações selecionadas

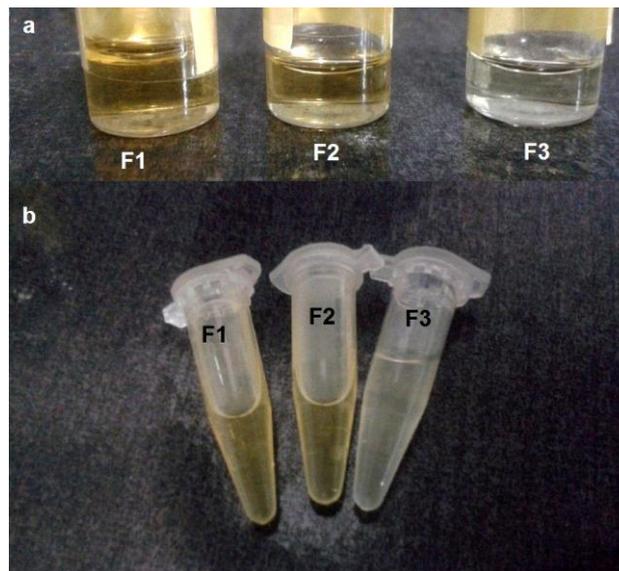
Através de dados físico-químicos é possível confirmar a formação de microemulsões, bem como efetuar modificações no seu comportamento para fins específicos (ROSSI et al., 2007). Porém, a caracterização da estrutura formada em sistemas dispersos, como as ME, possui algumas limitações. Com a necessidade da diluição prévia da amostra, podem ocorrer reorganizações moleculares ou transições de fase, constituindo-se uma limitação para a caracterização do sistema

(LAWRENCE & REES, 2000). Nesse sentido, os parâmetros avaliados neste trabalho (análise macroscópica, pH, condutividade, índice de refração e estabilidade preliminar) foram realizados sem diluição, proporcionando resultados mais acurados, que servem de base para a continuação ou modificação dos estudos com a ME.

5.4.1 Análise macroscópica

Todas as amostras selecionadas apresentaram um aspecto límpido e translúcido de coloração amarelada, embora a F3 tenha exibido uma coloração mais clara (Figura 5). Em 72 horas após a preparação das amostras, a F2, que inicialmente apresentava-se mais semissólida que as outras tornou-se líquida e a F3, inicialmente líquida, adquiriu o aspecto de um gel bastante consistente. A formulação F1 manteve-se líquida durante todo o período do estudo.

Figura 5 – Aspecto visual das formulações selecionadas.



(FONTE: Dados da pesquisa.)

5.4.2 Caracterização das formulações

A Tabela 3 indica os valores obtidos na caracterização das amostras selecionadas.

Tabela 3 – Caracterização físico-química das formulações selecionadas

PARÂMETROS	AMOSTRAS		
	F1	F2	F3
pH ± DP	5,32 ± 0,01	6,25	6,61 ± 0,01
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) ± DP	6,05 ± 0,07	2,18 ± 0,001	6,18 ± 0,03
Índice de Refração	1,4605	1,4645	1,4585

DP = Desvio Padrão.

Uma vez que o pH do meio pode influir sobre o grau de ionização e a solubilidade lipídica do fármaco, a variação de pH ao longo do trato gastrointestinal, que varia de pH 1 no estômago até aproximadamente pH 7 ou 8 no intestino, é um fator importante tanto para o grau de absorção do fármaco como para o local em que ocorre. No intestino delgado (pH próximo de 6,5), que possui uma ampla superfície de absorção, tanto ácidos fracos quanto bases fracas são bem absorvidos (AULTON, 2005).

De forma geral, para aplicação tópica, o pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica para produtos cutâneos, compreendendo valores de 5,5 a 8,0 (SILVA et al., 2009a). Portanto, as formulações possuem pH compatível tanto para administração oral quanto para administração tópica. Estes valores de pH verificados também encontram-se dentro da faixa de maior estabilidade física e química para formulações (pH 5,5 a 8,0) (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004).

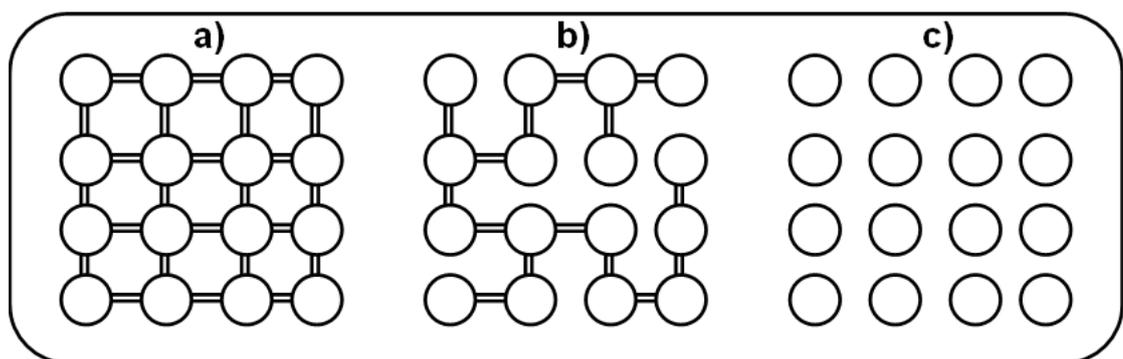
Propriedades macroscópicas de microemulsões como condutividade elétrica estão correlacionadas com os tipos de microestruturas presentes no fluido. A condutividade elétrica é uma ferramenta sensível e frequentemente utilizada na investigação de mudanças estruturais em macro e microemulsões (ROSSI et al., 2007). Medidas de condutividade apresentam-se como um importante meio na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos em um sistema microemulsionado (LAWRENCE & REES, 2000).

Segundo Zhang & Michniak-Kohn (2011) quando as microemulsões apresentam suas microestruturas água em óleo (A/O) a condutividade é baixa, devido às gotículas de água estarem isoladas pelo filme de tensoativos. À medida

que se eleva a concentração de água no sistema, as gotículas de água isoladas pelo filme de tensoativos começam a agregar-se aumentando a condutividade e formando canais interconectados, dando origem às microemulsões bicontínuas. Portanto, esperava-se uma condutividade alta desses sistemas, principalmente naqueles cujo teor de água é alto ($F3 = 47,1\%$).

No entanto, a condutividade elétrica se mostra como um parâmetro muito sensível quanto à determinação das transições de fase em microemulsões. Essas mudanças no comportamento estrutural estão intimamente relacionadas com drásticas mudanças nos mecanismos de transporte elétrico no material. Quando se tem um meio contínuo óleo (A/O), podem ser formados canais de água interligando as gotículas, fazendo com que o transporte de íons ou de espécies moleculares possa existir e a condutividade do sistema seja maximizada. Na direção à transição de fase A/O em O/A (promovida por uma variação na temperatura ou fração dos componentes), tem-se a progressiva eliminação desses caminhos condutores até que todos os canais sejam desfeitos e a condutividade passe a ser diminuída por ordens de grandeza. Esse mecanismo é conhecido na literatura como o fenômeno da antipercolação (Figura 6) (ARAÚJO, 2009).

Figura 6 – Visão pictórica do fenômeno da antipercolação



Legenda: a) gotículas de água interconectadas por canais na fase contínua de óleo; b) canais de água rompidos entre gotículas adjacentes; c) gotículas de água desconectadas. (FONTE: ARAÚJO, 2009)

É possível que a medição de condutividade tenha acontecido durante um processo de antipercolação, ou seja, de transição de fase contínua.

O aumento na quantidade de fase aquosa nas formulações influencia o índice de refração (IR), que diminui para valores mais próximos do IR da água (1,333) se

distanciando do IR do óleo de alecrim (1,465 a 1,473), embora a diferença seja pequena para estas amostras.

5.4.3 Avaliação da estabilidade

Uma das principais diferenças entre uma emulsão e uma microemulsão é a elevada estabilidade da microemulsão, com consequente resistência à sedimentação. Normalmente, uma emulsão quebra sob a ação de uma força física (gravidade ou força centrífuga), o que não ocorre com uma microemulsão (ROSSI et al., 2007).

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas no seu interior, deixando visível possíveis instabilidades.

Após a realização dos testes de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo/degelo não foram observadas nenhuma alteração de cor, turbidez, precipitação ou separação de fases (Tabela 4), demonstrando uma ótima estabilidade preliminar das formulações frente à força física ou a alterações extremas de temperatura, o que fortalece a hipótese de estabilidade termodinâmica, característica de ME. Durante um período de seis meses em que as amostras estiveram sob observação também não foi registrado nenhum tipo de modificação aparente.

Tabela 4 – Avaliação da estabilidade preliminar das formulações selecionadas

MÉTODO	F1	F2	F3
CENTRIFUGAÇÃO	Estável	Estável	Estável
ESTRESSE TÉRMICO	Estável	Estável	Estável
CICLO GELO/DEGELO	Estável	Estável	Estável

6 CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A técnica empregada para construção dos diagramas de fases pseudoternários mostrou-se bastante simples, reprodutível e de grande utilidade, mostrando com clareza as várias regiões do diagrama, incluindo as regiões possíveis de formação de ME, facilitando na escolha das proporções dos componentes;
- O DFPT utilizado no presente trabalho apresentou uma área extensa de formação de sistemas transparentes, ampliando as possibilidades de formulações que possam ser utilizadas como sistemas de liberação de fármacos;
- As propriedades físico-químicas das formulações obtiveram resultados favoráveis à aplicação tanto pela via tópica quanto pela oral;
- As formulações escolhidas apresentaram uma ótima estabilidade preliminar;
- Os estudos realizados sugerem uma ME contendo óleo essencial de alecrim como promissor agente antimicrobiano como alternativa terapêutica, a ser comprovado em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- AL-SEREITI, M.R.; ABU-AMER, K.M.; SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol. 37, n. 2, p. 124-131, 1999.
- ALTHANYAN, M.S.; ASSI, K.H.; CLARK, B.J.; HANAEE, J. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 55, n. 3, p. 397-402, 2011.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.
- ARAÚJO, E.S. **Caracterização elétrica e óptica de transições de fase em colóides e microemulsões**. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Juazeiro, Bahia, 2009.
- ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.64, n.1, p.23-35, 2006.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- BELL, I.E.; SCHWARTZ, G.E.; BOYER, N.N.; KOITHAN, M.; BROOKS, A.J. Advances in integrative nanomedicine for improving infectious disease treatment in public health. **European Journal of integrative medicine**, vol. 5, n. 2, p. 126-140, 2013.
- BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.
- BOZIN, B.; DUKIC, N.M.; SAMOJLIK, I.; JOVINO, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 55, p. 7879-7885, 2007.
- BRITO, V.S.F.; DANTAS, I.C.; DANTAS, G.D.S. Plantas medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca – PB. **BioFar – Revista de Biologia e Farmácia**, vol. 3, n. 1, p. 112-123, 2009.
- CERA, R.F.L. **Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro**. 2001. 145p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2001.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DANTAS, I.C. **O raizeiro**. 1ª ed. Campina Grande: EDUEPB, 2007. 390 p.

DAS, M.K.; BATTACHARYA, A.; GHOSAL, S.K. Effect of Different Terpene-Containing Essential Oils on Percutaneous Absorption of Trazodone Hydrochloride Through Mouse Epidermis. **Drug Delivery**, vol. 13, n. 6, p. 425-431, 2006.

FAIXOVÁ, Z.; FAIX, S. Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) essential oil (A Review). **Folia Veterinaria**, vol. 52, n. 3-4, p. 135-139, 2008.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, n.5, p.306-313, 2012.

FARIA, L.R.D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim)** – Atividades anti-inflamatória e analgésica. 2005. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Unifenas, Alfenas, Minas Gerais, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira, 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, vol. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, vol. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, vol. 21, p. 989-994, 2007.

FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL. **Guia do Jardim Botânico de Porto Alegre**. Porto Alegre: Jardim Botânico de Porto Alegre, 2005. 100 p.

GILLILAN, J. **Improvement of U.S. EPA minimum risk essential oils' pesticide activity through surfactante enhancement and synergy**. 2012. Tese (Doutorado em Horticultura e Fitotecnia) – The Ohio State University, Columbus, Ohio, 2012.

GOMES, N.G.M.; CAMPOS, M.G.; ÓRFÃO, J.M.C.; RIBERO, C.A.F. Plants with neurobiological activity as potential target for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, vol. 33, p. 1372-1389, 2009.

GRAMPUROHIT, N., RAVIKUMAR, P., MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use – A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, vol. 45, n. 1, 2011.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, vol. 1, n. 5, p. 311-326, 1949.

GRIFFIN, W.C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, vol. 5, n. 4, p. 249-256, 1954.

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, 2013.

GUPTA S.; MOULIK S.P. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Science**, vol. 97, n. 1, p. 22-45, 2008.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop – The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 92, p. 147–162, 2004.

HOAR T.P.; SCHULMAN, J.H. Transparent water-on-oil dispersions, the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, vol. 152, p. 102-103, 1943.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHATHA, S.A.S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P.S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 41, n. 4, p. 1070-1078, 2010.

JARRAR, N.; ABU-HIJLEH, A.; ADWAN, K. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 3, n. 2, p. 121-123, 2010.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.J.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.J.; ZU, Y.G.; LIU, X.L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 32, p. 63-68, 2011.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 11^a ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777 p.

JORDÁN, M.J.; LAX, V.; ROTA, M.C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Control**, vol. 30, p. 463-468, 2013.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 45, p. 89-121, 2000.

LI, G.; FAN, Y.; LI, X. WANG, X.; LI, Y.; LIU, Y.; LI, M. In vitro and in vivo evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.425, n.1-2, p. 53-61, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estados da Flora LTDA., 2002. 261 p.

MACEDO, J.P.F.; FERNANDES, L.L.; FORMIGA, F.R.; REIS, M.F.; NAGASHIMA JR., T.; SOARES, L.A.L.; EGITO, E.S.T. Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. **AAPS PharmSciTech**, vol. 7, n. 1, p. 146-152, 2006.

MANJENA, T.; MUYIMA, N.Y.O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 28, p. 291-296, 1999.

MARCHIORI, V.F. **Rosmarinus officinalis**. 2004. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) – Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa, Colombo, Paraná, 2004.

MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.F.M.; ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, vol. 103, p. 778-786, 2007.

MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, vol. 8, p. 1719-1729, 2012.

MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Micelles, vesicles and microemulsions. **Journal of the Chemical Society**, vol. 2, p. 601-629, 1981.

MITTAL, L.K. **Handbook of microemulsion science and technology**. New York: Promod Kumar, 1999. p.113.

NAKATSU, T.; LUPO JR., A.T.; CHINN JR., JW; KANG, R.K.L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Studies in Natural Products Chemistry**, vol. 21, p. 571-631, 2000.

NAOUI, W.; BOLZINGER, M.A.; FENET, B.; PELLETIER, J.; VALOUR, J.P.; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. **Pharmaceutical Research**, vol. 28, n. 7, p. 1683-1695, 2011.

NASCIMENTO, G.G.F; LOCATELLI, J.; FREITAS P.C.; SILVA, G.L.E. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NOGUEIRA, J.C.R.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E.O. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, vol. 74, n. 1, p. 118-124, 2008.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R., FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, vol.27, n.1, p. 131-138, 2004.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 37, n. 23, p. 155-162, 1997.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 120, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

PETROLINI, F.V.B.; LUCARINI, R.; SOUZA, M.G.M.; PIRES, R.H.; CUNHA, W.R.; MARTINS, CHG. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 44, n. 3, p. 829-834, 2013.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim: Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v.19, n.2, p. 193-210, 2001.

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

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2012.

RIBEIRO, D.S.; MELO, D.B.; GUIMARÃES, A.G.; VELOZO, E.S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica, RJ: EDUR, vol. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2007.

SAGORCHEV, P.; LUKANOV, J.; BEER, A.M. Investigations into the specific effects of rosemary oil at the receptor level. **Phytomedicine**, vol. 17, n. 8-9, p. 693-697, 2010.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, vol. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SCHULMAN, J.H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L.M. Mechanism of formation and structure of microemulsions by electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, vol. 63, p. 1677-1680, 1959.

SILVA, J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão *gel-like*. **Química Nova**, vol. 32, n. 6, p.1389-1393, 2009.

SILVA, J.A.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BORBA, V.F.C.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 90, n. 3, p. 245-249, 2009.

SOLANS, C.; KUNIEDA, H. **Industrial Applications of Microemulsions**. New York: Marcel Dekker, INC, 1997. 401 p.

SOLIMAN, F.M.; EL-KASHOURY, E.A.; FATHY, M.M.; GONAIID, M.H. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 9, n. 1, p. 29-33, 1994.

STAHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; MARTINEZ, J.R. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in vitro* antioxidant activity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 373, n. 1-2, p. 70-74, 2002.

SVOBODA, K.P.; DEANS, S.G. A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 7, n. 2, p. 81-87, 1992.

SZUMNY, A.; FIGIEL, A.; GUTÉRRIZ-ORTÍZ, A.; CARBONELL-BARRACHINA, A.A. Composition of Rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, vol. 97, p. 253-260, 2010.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L.E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S.M.; DINIZ, S.P.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, vol. 11, n. 4, p. 741-746, 2008.

TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; PATHAN, S.A.; KHAN, Z.I. Microemulsions: A novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, vol. 2, p. 238-257, 2008.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, vol. 16, n. 5, p. 461-521, 1999.

VIJAYAN, P.; RAGHU, C.; ASHOK, G.; DHANARAJ, S.A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 120, n. 1, p. 9-11, 2004.

YAP, P.S.X.; YIAP, B.C.; PING, H.C.; LIM, S.H.E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, vol. 8, p. 6-14, 2014.

ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JR., A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA, A.B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, vol. 3, n. 1, p. 13-18, 2002.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 421, p. 34-44, 2011.