



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA GRACILIS*: Obtenção,
Caracterização e Potencial Ação Amebicida**

VANESSA DOS SANTOS ALCANTARA NASCIMENTO

São Cristóvão

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA GRACILIS*: Obtenção,
Caracterização e Potencial Ação Amebicida

VANESSA DOS SANTOS ALCANTARA NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para a obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**.

Orientadora: **Prof.^a. Dr.^a. Rogéria de Souza Nunes**

Co-orientador: **Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella**

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos e Medicamentos.

São Cristóvão

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA PROFESSOR ALBERTO CARVALHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

N244s Nascimento, Vanessa dos Santos Alcantara.
Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *lippia gracilis*: obtenção, caracterização e potencial ação amebicida / Vanessa dos Santos Alcantara Nascimento; orientadora Rogéria de Souza Nunes; co-orientador Silvio Santana Dolabella. – Itabaiana, 2016.
91 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)
– Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Acanthamoeba. 2. Ceratite amebiana. 3. Microemulsão. 4. *Lippia gracilis*. I. Nunes, Rogéria de Souza. II. Dolabella, Silvio Santana. III. Título.

CDU 561.24

VANESSA DOS SANTOS ALCANTARA NASCIMENTO

**SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA GRACILIS*: Obtenção,
Caracterização e Potencial Ação Amebicida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

LOCAL, _____ de _____ de _____

Orientador: Prof.^a. Dr^a Rogéria Souza Nunes

1º Examinador: Prof.^a. Dr^a Ana Amélia Moreira Lira

2º Examinador: Prof.^a. Dr^a. Luciene Barbosa

PARECER

DEDICATÓRIA

Dedido este trabalho à minha família,
minha maior incentivadora na busca do
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu criador, Deus, por ter me dado sabedoria e permitido que eu chegasse com vida e saúde a este momento tão esperado.

Aos meus pais, Hercília e Ezequias (In memoriam), meu infinito agradecimento, pois vocês são os principais responsáveis pela minha educação e pela pessoa que sou hoje. Obrigada, mãe, pelo seu apoio incondicional ao longo deste processo. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Você é minha fortaleza.

Ao meu esposo, Danilo, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigada por me incentivar desde o início e me fazer acreditar que posso mais do que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Ao meu pequeno Lucas, amor da minha vida, que durante esse processo passou longos momentos longe da mamãe. Obrigada pela sua existência e por todo amor e carinho que tem por mim.

À minha irmã, Andreza, que sempre esteve ao meu lado me dando suporte em todas as situações. Obrigada pelo carinho, amor e cumplicidade. Nunca esquecerei tudo que faz por mim!

Agradeço à minha orientadora Prof.^a. Dr.^a. Rogéria de Souza Nunes, pela liberdade e confiança na realização deste trabalho, além da sua compreensão em momentos difíceis.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella, pela sua paciência e dedicação em seus ensinamentos e ao apoio oferecido a este trabalho.

Aos professores Victor, Ana Amélia, Luciene e Cristiane pelas sugestões e colaborações para a realização desta dissertação.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que sempre estiveram prontos para me ajudar nos experimentos, nas dúvidas e em tudo que precisei. Em especial a Alyne, Juliana, Joyce, Glauciene e Dani.

À katlyn e a Mariana, pessoas especiais, que conheci neste mestrado. Obrigada pela força e por não terem me deixado desistir. Sinto que nós percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Por fim, aos meus amigos do trabalho, que sempre compreenderam a importância do mestrado para mim. Obrigada pela força e pela ajuda nos momentos em que estive ausente.

Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.

Augusto Cury

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL), pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em diversos tipos de solo e água, no ar, em ar-condicionado e esgotos, entre outros ambientes. Essas amebas são capazes de ocasionar graves doenças nos seres humanos, destacando a encefalite granulomatosa e a ceratite amebiana. A ceratite amebiana é uma doença infecciosa que acomete a córnea e que pode levar a cegueira, apresentando sintomas como visão borrada, dor intensa, fotofobia e aumento da pressão ocular. Os usuários de lentes de contato são os mais propícios a este tipo de infecção, pois podem apresentar microtraumatismos na córnea, o que torna o ambiente favorável a ação dessas amebas. Ainda não existe um tratamento eficaz para esta doença e a maioria dos medicamentos utilizados sofre resistência por parte do parasito e outros, como os corticosteróides, podem apresentar uma melhora inicial, mas em seguida o agravamento da doença. As soluções para limpeza das lentes de contato também não são tão eficientes em eliminar este parasita, uma vez que a ISO 14729 e a FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), que regulamentam os requisitos microbiológicos e os métodos de ensaio para a produção de produtos de higiene para lentes de contato, não obrigam que essas soluções sejam testadas contra *Acanthamoeba*, o que torna os usuários de lentes mais propícios a este tipo de infecção. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas microemulsionados, contendo o óleo essencial de *Lippia gracilis* como fase oleosa e analisar sua potencial ação amebicida frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. As formulações foram preparadas através do uso do diagrama de fase, utilizando o Tween 80 e o propilenoglicol como tensoativo e cotensoativo, respectivamente, do sistema. A caracterização físico-química das formulações foi realizada por meio de análises de microscopia de luz polarizada, reologia, espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS), condutividade elétrica, tamanho de partícula e índice de polidispersão. Foram realizados ensaios de atividade amebicida frente à trofozoítos de *A. castellanii* da formulação em questão e de todos os seus excipientes separados. As amostras obtidas apresentaram-se transparentes e termodinamicamente estáveis com tamanho de gotícula e índice de polidispersão característicos de microemulsão. As formulações apresentaram-se isotrópicas na microscopia de luz polarizada e, através das curvas de SAXS, foi possível observar que as formulações apresentaram características de microemulsão bicontínua. Estas formulações mostraram baixa condutividade elétrica a qual pode estar associada a alta quantidade de tensoativo não iônico. As propriedades reológicas do sistema demonstraram que estes possuem comportamento newtoniano característico de microemulsão e que a viscosidade aumenta quando diminui a quantidade de óleo e, consequentemente, o tamanho da gotícula. Nos ensaios biológicos, os tensoativos não apresentaram atividade significativa frente aos trofozoítos e o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou uma IC₅₀ de 9,52µg/ml. Quando o teste foi realizado com a microemulsão contendo o mesmo óleo, essa IC₅₀ caiu para 2,55 µg/ml e, ao utilizar uma formulação com tamanho de gotícula menor, esse valor caiu para 0,65 µg/ml, comprovando, assim, a eficácia do nanossistema.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*. Ceratite amebiana. Microemulsão. *L. gracilis*.

ABSTRACT

Free-living amoebae (AVL), belonging to the genus *Acanthamoeba* are widely distributed in nature, being found in various types of soil and water, in the air, in air conditioning and sewage, and other environments. These amoebae are able to cause severe disease in human beings, highlighting the granulomatous amoebic encephalitis and keratitis. The amoebic keratitis is an infectious disease that affects the cornea and it can lead to blindness, with symptoms such as blurred vision, intense pain, photophobia and increased eye pressure. Users of contact lenses are more amenable to this type of infection because they may present microtraumas in the cornea, which makes the environment favorable action of these amoebae. There is no effective treatment for this disease and most used drugs suffers resistance from the parasite and others such as corticosteroids, they may give an initial improvement, but then the worsening of the disease. The solutions for cleaning contact lenses are also not efficient in eliminating this parasite, since the ISO 14729 and FDA (Food and Drug Administration, USA), which regulate the microbiological requirements and test methods for the production of hygiene products for contact lenses do not require that such solutions are tested against *Acanthamoeba*, which makes users more amenable to this type of lenses infection. In view of this, the objective of this study was to develop a microemulsion with the essential oil of *L. gracilis* and check its amoebicide potential front of trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. The formulations were prepared by using the phase diagram, using Tween 80 and propylene glycol as surfactant and co-surfactant of the system. The physico-chemical characterization of the formulations was performed by analysis of polarized light microscopy, rheology, light low angle scattering (SAXS), electrical conductivity, particle size and polydispersity. Amoebicide front activity assays for trophozoite *A. castellanii* formulation in question and all its separate excipients were performed. The obtained samples had transparent and thermodynamically stable to droplet size and characteristic polydispersity index microemulsion. The formulations presented are isotropic in polarized light microscopy and, through SAXS curves, it was observed that the formulations showed characteristics bicontinuous microemulsion. These formulations showed low electrical conductivity which can be associated with high amount of nonionic surfactant. The rheological properties of the system have shown that they possess newtonian behavior characteristic of microemulsion and that the viscosity increases when the amount of oil decreases and hence the droplet size. In bioassays, the surfactants showed no significant activity against the trophozoites and the essential oil of *L. gracilis* showed an IC₅₀ of 9,52µg / ml. When the test was conducted with the microemulsion containing the same oil, this IC 50 fell to 2.55 µg / ml and using a formulation with smaller droplet tamnho this value fell to 0.65µg/ml, thus proving the efficacy of nanossistema.

Keywords: *Acanthamoeba*, amoebic keratitis, microemulsion, *L. gracilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Necrose hemorrágica no tecido cerebral causada por <i>Acanthamoeba</i>	22
Figura 2 – Ceratite amebiana: inflamação da córnea com infiltrado inflamatório estromal em forma de anel ocasionado por <i>Acanthamoeba</i>	24
Figura 3 – Aspecto botânico de <i>L. gracilis</i> : folhas e flores.....	26
Figura 4 – Representação esquemática dos tipos de microemulsão.	31
Figura 5 – Esquema ilustrativo de uma molécula de tensoativo.....	32
Figura 6 – Estrutura química do Tween 80 (Polissorbato).....	34
Figura 7 – Estruturas previstas de agregação das micelas de acordo com o fator de empacotamento	36
Figura 8 – Ilustração de um diagrama de fases feito por titulação com a fase aquosa.	37
Figura 9 – Representação dos pontos de titulação e regiões do diagrama de fases ..	38
Figura 10 – Representação de Curvas Reológicas demonstrando os 4 tipos de classificação reológica dos fluídos	42
Figura 11 – Diagramas de fases A e B e as microemulsões obtidas.....	57
Figura 12 – Microemulsões obtidas a partir dos diagramas de fases A e B	59
Figura 13 – Fotomicrografia do comportamento isotrópico (campo escuro) representada pela microemulsão A12 do diagrama A.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> por cromatografia gasosa.....	52
Gráfico 2 – Concentração micelar crítica do tween 80	55
Gráfico 3 – Concentração micelar crítica do Tween 80 / Propilenoglicol 1:1	55
Gráfico 4 – Concentração micelar crítica do Tween/ propilenoglicol 2:1	56
Gráfico 5 – Curvas de SAXS das amostras A1 a A9	61
Gráfico 6 – Curvas de SAXS das amostras A10 a A12	63
Gráfico 7 – Curvas de SAXS das amostras A13 a A17	64
Gráfico 8 – Curvas de SAXS das amostras A18 a A21	64
Gráfico 9 – Reograma das formulações obtidas (A1-A9, A10-A12, B1-B5, B6-B9). ..	66
Gráfico 10 – Atividade amebicida do tween 80, propilenoglicol e da mistura tween 80 / propilenoglicol 1:1.	69
Gráfico 11 – Atividade amebicida do óleo <i>L. gracilis</i>	70
Gráfico 12 – Atividade amebicida da amostra 12	71
Gráfico 13 – Atividade Amebicida da Amostra 9	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de timol e carvacrol encontrado na planta da espécie <i>L. gracilis</i> por quatro pesquisas diferentes.	27
Tabela 2 – Principais Constituintes Químicos do Óleo essencial de <i>L. gracilis</i> com suas respectivas porcentagens.	52
Tabela 3 – Valores da tensão superficial para as diluições do Tween 80 e do Tween 80 com o propilenoglicol 1:1 e 2:1	53
Tabela 4 – Composição centesimal das amostras A1-A12 do diagrama A (Tween / Propilenoglicol 1:1) e B1-B9 do diagrama B (Tween / Propilenoglicol 2:1).....	58
Tabela 5 – Condutividade elétrica das amostras dos DIAGRAMAS	62
Tabela 6 – Relação quantidade de tensoativo x distância das gotículas.....	65
Tabela 7 – Relação viscosidade em função do tamanho da gotícula e quantidade de óleo.....	66
Tabela 8 – Atividade citotóxica do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> , do tween 80 / Propilenoglicol 1:1 e da formulação sobre fibroblastos	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
A	Água
AVL	Amebas de Vida Livre
CMC	Concentração Micelar Crítica
Co-t	Cotensoativo
CP	Cone/placa
DF	Diagrama de fase
DFPT	Diagrama de Fases Pseudoternário
DFT	Diagrama de fase ternário
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and drug administration
GAE	Encefalite granulomatosa
IC50	Half maximal inhibitory concentration
IR	Índice de Refração
ISO	Organização Internacional para Padronização
LABAM	Laboratório de Biotecnologia Ambiental
LADEF	Laboratório de desenvolvimento farmacotécnico
LC	Lentes de contato
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

ME	Microemulsão
MLP	Microscopia de Luz Polarizada
MTT	(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5 diphenyltetrazolium brometo
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano
O	Óleo
O/A	Óleo em água
OE	Óleo essencial
OELG	Óleo essencial de <i>L. gracilis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PYG	2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedura e 1,8% de glucose
SAXS	Espalhamento de Raios –X a baixo ângulo
T	Tensoativo
WAXS	Espalhamento de Raios-X a alto ângulo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius
Hz	Hertz
µg/ml	Microgramas por mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
uΩ/cm	Micro-ohm por centímetro
µS.cm⁻¹	Micro
ml	Mililitros
nm	Nanômetro
Pa	Pascal
Pa.s	Pascal segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	AMEBAS DE VIDA LIVRE (AVL)	20
2.1.1	Doenças causadas pelas Amebas de Vida Livre	21
<i>2.1.1.1</i>	<i>Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)</i>	<i>21</i>
<i>2.1.1.2</i>	<i>Ceratite amebiana</i>	<i>23</i>
2.2	Os ÓLEOS ESSENCIAIS (OE).....	25
2.2.1	Óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	26
2.3	O USO DA NANOTECNOLOGIA E DAS MICROEMULSÕES.....	28
2.4	TENSOATIVOS	32
2.5	DIAGRAMAS DE FASE	36
2.6	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	38
2.6.1	Microscopia de Luz Polarizada.....	39
2.6.2	Condutividade Elétrica	39
2.6.3	Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos (SAXS).....	40
2.6.4	Reologia.....	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	MATERIAIS.....	45
4.2	EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS.....	45
4.3	MÉTODOS.....	46
4.3.1	Extração do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	46
<i>4.3.1.1</i>	<i>Determinação da densidade do óleo.....</i>	<i>46</i>
<i>4.3.1.2</i>	<i>Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial.....</i>	<i>46</i>
4.3.2	Análise da Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica.....	47
4.3.3	Obtenção das microemulsões através de diagrama de fases pseudoternário.....	48
4.3.4	Caracterização dos Sistemas	48
<i>4.3.4.1</i>	<i>Microscopia de luz Polarizada</i>	<i>48</i>
<i>4.3.4.2</i>	<i>Condutividade Elétrica.....</i>	<i>49</i>
<i>4.3.4.3</i>	<i>Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo.....</i>	<i>49</i>
<i>4.3.4.4</i>	<i>Reologia</i>	<i>49</i>

4.3.4.5	<i>Tamanho de gotícula e índice de polidispersão</i>	49
4.3.5	Citotoxicidade sobre células de cultura de mamíferos	50
4.3.6	Determinação da atividade amebicida	50
4.3.7	Análise Estatística	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	RENDIMENTO E DENSIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE L. GRACILIS	52
5.2	CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE L. GRACILIS	52
5.3	ANÁLISE DA TENSÃO SUPERFICIAL E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA	53
5.4	OBTENÇÃO DOS SISTEMAS ATRAVÉS DO DIAGRAMA DE FASES	57
5.5	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS MICROEMULSÕES	60
5.6	ESCOLHA DA FORMULAÇÃO PARA A ATIVIDADE AMEBICIDA	67
5.7	CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE CULTURA DE MAMÍFEROS	67
5.8	ATIVIDADE AMEBICIDA	68
5.8.1	Atividade amebicida dos excipientes da formulação	68
5.8.2	Atividade amebicida do óleo essencial de L. gracilis	70
5.8.3	Atividade amebicida das microemulsões contendo óleo essencial de L. gracilis	71
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares aeróbicos, pertencentes aos gêneros *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* e *Acanthamoeba*, sendo este último responsável por patologias em humanos e animais como encefalites, ceratites, infecções na pele, pulmonares e generalizadas (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b; KARUSKI, 2014). As *Acanthamoebas* são protozoários ubiquitários e anfizóicos, que podem viver livremente na natureza e agir como patógenos oportunistas. Apresentam-se como trofozoítos, forma ativa que se alimenta de bactérias, algas e leveduras, e como cistos, forma de resistência que são encontrados no solo, na poeira, na água ou nos alimentos (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; SIDDIQUI & KHAN, 2012a; SIDDIQUI & KHAN, 2012b).

As principais doenças ocasionadas pelas AVL do gênero *Acanthamoeba* são a encefalite amebiana granulomatosa, uma infecção cerebral, e a ceratite amebiana, uma infecção da superfície ocular que pode resultar em dor intensa e ulceração da córnea (KHAN & SIDDIQUI, 2009; CASTRILLÓN & OROZCO, 2013). A ceratite causada por *Acanthamoeba* geralmente está relacionada ao uso de lentes de contato, principalmente em usuários que fazem uso inadequado da solução multiuso, naqueles que têm falta de cuidados com a higienização dos estojos de armazenamento das lentes, que usam as lentes por períodos maiores que o recomendado, que não fazem acompanhamento médico, que usam solução salina feita em casa ou contaminada e, por fim, naqueles que nadam em piscinas, rios ou mares usando as lentes de contato (OBEID *et al*, 2003; FORISTER *et al*, 2009).

A ceratite amebiana é uma doença crônica, bastante dolorosa, que atinge a visão de indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos. Essa infecção pode ser caracterizada pela presença de ulcerações, inflamações, vermelhidão, irritação, lacrimejamento, edema na pálpebra, fotofobia e, em alguns casos, perda da visão (VISVESVARA & SHER-GREEN, 1990; RUTHES *et al*, 2004). É uma infecção de difícil diagnóstico, pois pode ser confundida com infecções fúngicas ou bacterianas e de difícil controle, pelo fato das amebas apresentarem resistência aos tratamentos existentes (BARROS, 2007; LORENZO-MORALES *et al*, 2013).

Os estojos das lentes, geralmente, são a fonte primária de contaminação e, uma vez que as lentes de contato desses estojos se contaminam, os micro-

organismos se proliferam, evoluindo para a formação de biofilmes causadores de várias patologias (HENRIQUES *et al*, 2015).

Há um dado relevante a respeito das soluções multiuso para lavagem de lentes de contato que pode contribuir para as infecções relacionadas à *Acanthamoeba*: segundo a ISO 14729 e a FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), que regulamentam os requisitos microbiológicos e os métodos de ensaio para a produção de produtos de higiene para lentes de contato, não são necessários que essas soluções sejam testadas contra *Acanthamoeba*, o que torna os usuários de lentes vulneráveis a este tipo de infecção. Confirmando esse fato, Mohammadinia *et al* (2012) avaliaram a eficácia da solução multiuso de poliquaternário-1 e verificaram que esta tinha atividade limitada contra *Acanthamoeba*.

Tem-se buscado novas substâncias e sistemas terapêuticos que inibam a formação dos cistos ou que sejam eficazes na eliminação dos trofozoítos, uma vez que pacientes têm apresentado reincidência da doença, devido à resistência a alguns fármacos utilizados e, além disso, observa-se também a ocorrência de efeitos colaterais aos fármacos utilizados nos esquemas terapêuticos (OHNISHI *et al*, 2014).

Existem alguns óleos essenciais (OE) que têm se mostrado eficazes frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba*, como o trabalho realizado por Santos *et al* (2016), no qual comprovaram a ação amebicida dos óleos extraídos das plantas *L. gracilis*, *L. alba*, *L. sidoides* e *L. pedunculosa*. Essas espécies pertencem ao gênero *verbanaceae* e estão presentes em solos arenosos, em regiões tropicais e subtropicais (ATTI-SERAFINI *et al*, 2002; MELO *et al*, 2014). Das espécies acima citadas, a *L. gracilis* foi a que apresentou maior atividade, com uma IC₅₀ de 10,03µg/ml. Seu óleo é extraído das folhas e flores e há trabalhos que comprovaram sua atividade anti-inflamatória, antibacteriana, inseticida, analgésica, antioxidante, larvicida e leishmanicida (SILVA *et al*, 2008; MENDES *et al*, 2010; BARBOSA *et al*, 2010; GUILHON *et al*, 2011; MELO *et al*, 2013; DIAS *et al*, 2015).

Baseado no trabalho de Santos *et al* (2016) e com o objetivo de melhorar o desempenho das atividades dos óleos essenciais frente às AVL do gênero *Acanthamoeba*, pode-se utilizar a nanotecnologia farmacêutica como aliada. Esta tem sido utilizada como estratégia para estabelecer terapias mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança, minimizar os efeitos

colaterais e, no caso dos óleos essenciais, poder reduzir bastante sua instabilidade, volatilidade e hidrofobicidade (GRILL *et al*, 2009; VENUGOPAL *et al*, 2009). Na perspectiva da nanotecnologia, os sistemas microemulsionados surgem como uma excelente possibilidade de aperfeiçoar o efeito de fármacos e diminuir os efeitos indesejados no tratamento de doenças (SILVA *et al*, 2015).

As microemulsões são sistemas transparentes, de baixa viscosidade, que contém óleo e água estabilizados por tensoativos. São mais estáveis que as emulsões, possuem baixa viscosidade e um tamanho de gotícula muito pequeno, na ordem de nanômetros, o que facilita sua penetração ou permeação. Estes sistemas apresentam o potencial de carrear fármacos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, uma vez que são, por definição, sistemas dispersos, do tipo água/óleo, bicontínuos ou óleo/água. São capazes de compartimentalizar a substância ativa e otimizar o efeito, em função de um alto potencial de dispersão em diminutas gotículas (nanométricas) (EI-MAGHRABY *et al*, 2008; JAWORSKA *et al*, 2015). Diante dessas características do sistema, sugere-se que o mesmo seja adequado para veicular substâncias hidrofóbicas, assim como o óleo essencial de *L. gracilis*.

Partindo desse princípio e pelo fato de, até o presente momento, não existir na literatura trabalhos envolvendo microemulsão para avaliação da atividade amebicida, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *L. gracilis*, como fase oleosa, e analisar sua potencial ação amebicida frente à trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AMEBAS DE VIDA LIVRE (AVL)

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários oportunistas amplamente distribuídos na natureza e anfizóicos, com capacidade de viverem livremente no ambiente (BONILLA-LEMUS *et al*, 2014). As AVL são constituídas pelos gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia*, sendo que *Acanthamoeba* é o gênero mais estudado, responsável por diversas patologias em humanos e animais (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b; QVARNSTROM, NERAD & VISVESVARA, 2013). Dentre esse gênero, cerca de 24 espécies foram identificadas e associadas às doenças em humanos, incluindo *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. healyi* e *A. byers* (QVARNSTROM, NERAD & VISVESVARA, 2013; CAUMO *et al*, 2014).

As AVL do gênero *Acanthamoeba* podem ser encontradas no solo, poeira, ar, água do mar, água potável, piscinas, água de esgoto, soluções para lavagem ocular, lentes de contato, unidades de diálise, unidades de tratamento dental e unidades hospitalares (TRABELSI *et al*, 2012; CORSARO *et al*, 2010). Além disto, elas podem tolerar uma vasta gama de condições físicas e químicas, como mudanças de temperatura, salinidade e condições de pH, permitindo-lhes sobreviver em água destilada, cultura de tecidos e fluidos corporais de mamíferos, podendo causar infecções no corpo humano (VISVESVARA & MAGUIRE, 2006).

Durante seu ciclo de vida, as *Acanthamoebas*, apresentam duas formas bem definidas: o cisto e o trofozoíto. Os trofozoítos funcionam como reservatórios para micro-organismos patógenos, resistentes à fagocitose por amebas, ajudando a dispersar esses agentes patogênicos aos humanos. Já os cistos são uma forma bastante resistente a variações físicas e químicas, como mudança de temperatura e alterações de pH (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; KHAN, 2006).

Quando os cistos entram em contato com o homem, através do trato respiratório, de lesões na pele, das mucosas ou de microtraumatismos na córnea, ocorre o desencistamento e se transformam em trofozoítos ativos, os quais podem se disseminar por via sanguínea, podendo causar várias doenças, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; KHAN, 2006).

O cisto possui uma parede interna (endocisto) e uma externa (ectocisto), compostas principalmente por proteínas e carboidratos, possuem poros denominados opérculos, pontos por onde a ameba sai quando ocorre o desencistamento entre as junções das duas paredes. O endocisto é formado, principalmente, por celulose, podendo apresentar a forma estrelada, poligonal ou arredondada. O ectocisto possui uma forma mais esférica e é composta por proteínas e polissacarídeos (ABEDKHOJASTEH *et al*, 2015; KHAN, 2006; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b).

Os trofozoítos possuem pseudópodes finos e filamentosos, citoplasma vacuolizado, com um vacúolo contrátil destacado. Esta é a forma metabolicamente ativa das amebas, que se alimentam de bactérias, fungos e partículas orgânicas por fagocitose, podendo atuar como hospedeiros de bactérias patogênicas (SAUTER, 2011; NEVES *et al*, 2011). É com essa forma que elas se reproduzem por divisão celular assexuada, conhecida como fissão binária (KHAN, 2006). Em contato com os seres humanos, esse gênero pode causar várias patologias, dentre as principais: ceratite amebiana – uma infecção ocular, e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) – uma infecção cerebral (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b; KARUSKI, 2014).

2.1.1 Doenças causadas pelas Amebas de Vida Livre

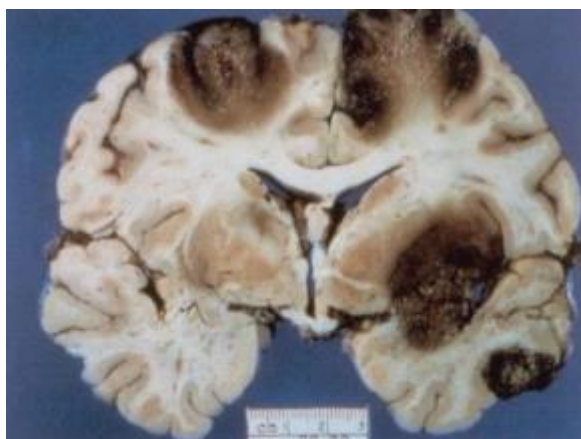
2.1.1.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

A encefalite amebiana granulomatosa é uma doença oportunista e fatal que ocorre principalmente em indivíduos debilitados, alcoólatras, doentes crônicos, pessoas submetidas a tratamento com drogas imunossupressoras e pacientes imunocomprometidos. No entanto, já foram descritos casos em indivíduos sem sinais de imunodepressão (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Essa doença pode ser ocasionada por diferentes espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*, por uma espécie do gênero *Balamuthia*, a *B. mandrillaris* e por uma espécie do gênero *Sapinia*, a *S. diploidea* (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). As amebas podem entrar no organismo do ser humano através do trato respiratório inferior ou de lesões na pele, se disseminar pelo sangue e atingir o cérebro, através do

revestimento endotelial dos capilares cerebrais (MARTINEZ, 1991; TRABELSI *et al*, 2012; KRISTENSSON, MASOCHA & BENTIVOGLIO, 2013; BAIG, 2015).

Quando a infecção já está instalada, os sintomas são semelhantes aos das patologias causadas por micro-organismos virais, meningite bacteriana e tuberculose. Dores de cabeça, febre, hemiparesia, alterações comportamentais, rigidez no pescoço, náuseas, vômitos, paralisia dos nervos cranianos, aumento da pressão intracraniana e convulsões são alguns sintomas causados pela EAG, podendo ocasionar até a morte do paciente (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997; KARUSKI, 2014).

Figura 1 – Necrose hemorrágica no tecido cerebral causada por Acanthamoeba



Fonte: MARCIANO-CABRAL & CABRAL (2003).

NA EAG, durante o processo de infecção, ocorre a formação de granulomas compostos por amebas, macrófagos, micróglia, células polimorfonucleares, células T e células B (KHAN, 2008). O desenvolvimento da doença é tão severo que lesões multifocais ou necrose hemorrágica no tecido cerebral é geralmente observada após necropsia (Figura 1) (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a). Existe uma grande dificuldade em realizar o diagnóstico dessa doença e, por conta disto, a maioria dos casos é diagnosticada após a morte. Exames de ressonância magnética, tomografia computadorizada e análise do líquido cefalorraquidiano podem ser utilizados para identificar as lesões cerebrais (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997).

Os medicamentos para a EAG são administrados por via intravenosa e incluem o isotionato de pentamidina, cetoconazol, sulfadiazina, fluconazol, anfotericina B, azitromicina, itraconazol ou rifampicina, que raramente levam a um

prognóstico de sucesso (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a; KHAN, 2008). Portanto, a encefalite amebiana é praticamente fatal por causa da dificuldade e atraso no diagnóstico da doença e da falta de antimicrobiano ideal para terapia (TRABELSI *et al*, 2012).

2.1.1.2 *Ceratite amebiana*

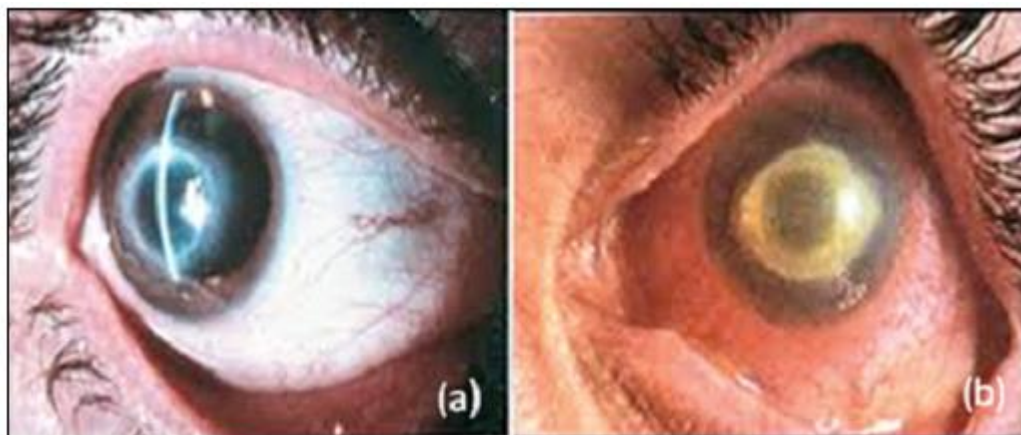
A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença relativamente rara. Os sintomas da doença incluem dor intensa, sensação de ter algo nos olhos, vermelhidão, visão desfocada, lacrimejamento, fotofobia e edemas. Geralmente ocorre após pequeno trauma da córnea, seguido por colonização da *Acanthamoeba*, proveniente de lentes de contato contaminadas. A característica clínica mais comum da ceratite amebiana é a presença de infiltrado estromal em anel (Figura 2 a e b). A Inflamação da córnea pode levar a danos oculares e, em casos severos onde pacientes não respondem ao tratamento médico e cirúrgico, enucleação dos olhos pode ser necessária (NAGYOVÁ; NAGY & TIMKO, 2010).

O número de casos de infecção na córnea causada por *Acanthamoeba* tem apresentado um aumento significativo nos últimos anos. A razão para esse aumento ainda não é muito clara, mas existem evidências que isso se deve, principalmente, ao aumento no número de usuários de lente de contato, ao uso equivocado de soluções de manutenção para lentes de contato e à melhoria dos diagnósticos existentes (PANJWANI, 2010; LORENZO-MORALES *et al*, 2013; OMAÑA-MOLINA *et al*, 2016).

Segundo Siddiqui (2012), existiam aproximadamente 120 milhões de usuários de lente de contato no mundo, mas o atual número de casos em todo o mundo é muito difícil estabelecer. Para Seal (2003), o número estimado de casos de ceratite amebiana era de 1,36 casos por milhão de lentes de contato nos EUA e 17 a 21 casos por milhão na Inglaterra. No Brasil, o primeiro caso de ceratite amebiana foi descrito em 2003, através de um relato de caso de uma paciente do sexo feminino, de 34 anos, usuária de lente de contato por três anos (OBEID *et al*, 2003).

A ceratite por *Acanthamoeba* se dá quando as amebas entram em contato com a córnea microtraumatizada. Essa contaminação pode ocorrer através do contato com água e partículas do ar ou do solo que contenham essas amebas (LLLINGWORTH, 1998; TRABELSI *et al*, 2012).

Figura 2 – Ceratite amebiana: inflamação da córnea com infiltrado inflamatório estromal em forma de anel ocasionado por Acanthamoeba



Fonte: VISVESVARA; MOURA & SCHUSTER (2007).

Ao entrar em contato com a córnea que tenha sofrido algum processo traumático, os trofozoítos aderem e penetram no epitélio. Essa adesão se deve à presença de proteínas na membrana do trofozoíto que se ligam às glicoproteínas do epitélio da córnea. Logo após os trofozoítos invadirem a córnea, ocorrem ulcerações e inflamações. Isso ocorre apenas em indivíduos com processos traumáticos na córnea, pois, em indivíduos normais, a imunoglobulina A e as proteases presentes no fluido lacrimal impedem a aderência da *Acanthamoeba* (SARAVANAN *et al*, 2008; KHAN, 2003). A ceratite amebiana pode apresentar sintomas como visão borrada, dor intensa, fotofobia, diminuição da sensibilidade corneana, aumento da pressão ocular e sensação de corpo estranho (OBEID *et al*, 2003).

Para o tratamento da ceratite amebiana, nenhum agente tópico tem sido descrito como eficaz. O tratamento desta infecção geralmente é realizado utilizando medicamentos como a propamidina, as biguaninas e a neomicina, todos de uso tópico e cetoconazol ou itraconazol por via oral (NEVES *et al*, 2011).

Se não houver sucesso com o tratamento medicamentoso, o transplante de córnea é indicado como opção terapêutica. Essa intervenção é recomendada quando, na fase aguda da infecção, a córnea se torna muito fina ou danificada e a visão é limitada (KITZMANN *et al*, 2009; NGUYEN *et al*, 2010; LORENZO-MORALES *et al*, 2013). Diante disto, pode-se inferir que a ceratite é uma doença de tratamento complicado e que ainda não existem métodos ou um único medicamento que possa eliminar o parasita (KHAN, 2009; LORENZO-MORALES *et al*, 2013).

2.2 Os ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)

Os óleos essenciais extraídos de plantas vêm sendo utilizados por um bom tempo para tratamento de enfermidades. São empregados nos cuidados terapêuticos da medicina popular e têm servido de base para despertar várias pesquisas na busca de novas formas de terapia originária das plantas (SAUTER, 2011). São produtos do metabolismo secundário das plantas e possuem diversas funções, uma delas é a sobrevivência vegetal, exercendo um papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIANI *et al*, 2000). Diante dessa realidade, várias investigações científicas comprovam a atividade antimicrobiana e antifúngica dos diversos óleos essenciais existentes (ARRUDA *et al*, 2006; NOGUEIRA; DIAZ; SAKUMO, 2007).

Esses óleos podem ser comercializados em sua forma bruta ou mais elaborada e podem ser aplicados na perfumaria, cosmética, alimentos e em medicamentos. O Brasil é considerado um país de bastante destaque no que se refere à produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais (OLIVEIRA & CREMASCO, 2014).

Os óleos essenciais são definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Possuem o sabor geralmente acre (ácido) e picante, são incolores ou ligeiramente amarelados, não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor e umidade (SIMÕES *et al*, 1999). São geralmente extraídos de plantas, mediante hidrodestilação, arraste a vapor d'água, fluido supercrítico, entre outros métodos. A quantidade e qualidade do produto da extração podem variar a depender do clima, composição do solo, órgão da planta e técnica de extração (ANGIONI *et al*, 2006; OLIVEIRA & CREMASCO, 2014).

Sua composição química também pode estar relacionada a vários fatores inerentes ao desenvolvimento da planta como as condições climáticas, a hora da coleta, o tempo de extração, a idade da planta, a genética, o meio ambiente e as técnicas de cultura (TAVARES *et al*, 2005; NOGUEIRA; DIAZ; SAKUMO, 2007). De acordo com os fatores acima, pode-se obter um rendimento maior ou menor de óleo e a presença ou ausência de certos componentes como compostos majoritários. O trabalho realizado por Souza *et al* (2012) corrobora as afirmações acima, no qual foi feito o plantio de três mudas de *L. gracilis* e as manteve com tratamentos de

adubação orgânica diferentes, mas no mesmo local de plantio e mesma quantidade de irrigação. Ao final da colheita e após a extração do óleo essencial, foi verificado que a produção total de biomassa e o rendimento do óleo essencial responderam positivamente ao aumento das doses de adubo aplicadas.

2.2.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *L. GRACILIS*

Das plantas medicinais usadas para fins terapêuticos, uma das espécies de grande importância é a da Família *Verbenaceae*, pertencente à ordem *Lamiales*. Esta família possui trinta e seis gêneros e um deles é o da *Lippia* (SANTOS *et al*, 2009). O gênero *Lippia* contém cerca de duzentas espécies de plantas e a maioria é nativa da América e África, cresce em solos arenosos ao redor dos rios e lagos e em regiões tropicais e subtropicais (ATTI-SERAFINI *et al*, 2002; MELO *et al*, 2014).

Existem algumas espécies deste gênero caracterizadas pela presença de óleos essenciais com atividades antimicrobianas, como é o caso da *L. gracilis* (Figura 3), conhecida no Brasil como alecrim-de-tabuleiro e nativa da região nordeste (ALBUQUERQUE *et al*, 2006). A *L. gracilis* é caracterizada por ter arbustos ramificados, com caule quebradiço, de até 2m de altura e por possuir folhas aromáticas e picantes (LORENZI & MATOS, 2008).

Figura 3 – Aspecto botânico de *L. gracilis*: folhas e flores.



Fonte: GONZAGA (2008)

Na crendice popular, o Alecrim-de-tabuleiro é utilizado para tratar várias doenças como gripe, tosse, sinusite, bronquite, congestão nasal, dor de cabeça, icterícia e, geralmente, são preparados como uma infusão e administrados por via oral. Também é usado como um macerado em álcool para administração tópica para o tratamento de feridas e sarna, como um bom antisséptico e em banhos para tratar e prevenir infecções do corpo (LORENZI & MATOS, 2008).

O óleo essencial de *L. gracilis* é extraído das suas folhas e flores e, geralmente, possui atividade anti-inflamatória, antibacteriana, inseticida, analgésica, antioxidante, larvicide, antileishmanicida (SILVA *et al*, 2008; BARBOSA *et al*, 2010; MENDES *et al*, 2010; GUILHON *et al*, 2011; MELO *et al*, 2013; DIAS *et al*, 2015). Essa atividade se justifica pela presença de monoterpenos fenólicos como o carvacrol e o timol (ALBUQUERQUE *et al*, 2006), que podem aparecer como componentes majoritários deste óleo essencial, variando numa faixa de 0,7-50,13% e 3,83-38,30%, respectivamente, conforme pode ser observado na Tabela 1 (OLIVEIRA, 2012).

Tabela 1 – Teor de timol e carvacrol encontrado na planta da espécie *L. gracilis* por quatro pesquisas diferentes.

Composto	%			
	SILVA <i>et al</i> (2008)	MOTTA NETO <i>et al</i> (2010)	MENDES <i>et al</i> (2010)	NEVES <i>et al</i> (2008)
Timol	3,83	4,92	32,68	38,30
Carvacrol	44,43	50,13	7,53	0,70
γ-Terpineno	9,16	8,08		14,9
α-Terpineno		1,46	1,76	
p-cimeno		10,73	17,82	
(Z)-b-Ocimeno				3,40
o-Cimeno	9,42			
b-Cariofileno	8,83	5,96	6,47	
Metil timol Etér	5,85	4,95		
Metil Timol			10,83	
Timol acetato				4,80
1,8-Cineol (Eucaliptol)		3,45	3,45	
Mirceno			3,35	0,70
b-Mirceno	1,67	2,08		
p-Acetilansol				10,10
α-Copaeno				3,80
Biciclogermacreno	2,88			
Total	86,07	91,76	83,89	76,70

Fonte: OLIVEIRA (2012)

Existem alguns estudos que comprovam essa atividade antimicrobiana e anti-inflamatória da *L. gracilis* citada anteriormente como, por exemplo, o estudo feito por Mendes *et al* (2010), o qual demonstrou que o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Outro estudo, ainda, foi o realizado por Pessoa *et al* (2005), o qual evidenciou que o extrato de folhas frescas desta planta apresentou atividade antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Segundo as observações de Knowles *et al* (2005), esta atividade pode estar relacionada com a ação do timol e o carvacrol, que podem desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e, consequentemente, gerando alterações na permeabilidade da membrana plasmática, o que resulta na morte da célula bacteriana. Ainda, segundo os autores, pode existir uma interação entre o carvacrol e o timol, promovendo uma ação sinérgica entre eles, potencializando a ação de ambos frente ao controle das células bacterianas.

Por ser uma planta de grande variabilidade de componentes e de intensa atividade antimicrobiana, sua atividade amebicida também foi investigada. Conforme estudos de Santos *et al* (2016), sobre a ação amebicida de óleos essenciais do gênero Verbenacea, a *L. gracilis* foi a espécie que apresentou maior atividade sobre os trofozoítos da *A. polyphaga*, em comparação com a *L. sidoides*, *L. alba* e *L. pedunculosa*. Apesar do trabalho de Santos *et al* (2016) ter obtido um excelente resultado na atividade amebicida do óleo essencial de *L. gracilis*, com o auxílio da nanotecnologia, esse resultado pode ser otimizado.

2.3 O USO DA NANOTECNOLOGIA E DAS MICROEMULSÕES

Os óleos essenciais possuem algumas peculiaridades que podem interferir na sua eficácia, pois possuem uma alta volatilidade, são bastante instáveis (fotossensíveis), insolúveis em água, podendo ficar aderido nas membranas celulares antes de chegar ao seu local de ação (NASCIMENTO *et al*, 2007). De acordo com Carlucci & Bregni (2009), essas características podem ser contornadas através da nanotecnologia e também está presente em 40% dos fármacos candidatos a novos medicamentos, como baixa solubilidade aquosa, baixa

capacidade de atravessar barreiras biológicas, baixa biodisponibilidade e baixa eficácia terapêutica do fármaco.

Diante desta problemática é que o uso da nanotecnologia surge com o intuito de facilitar a administração de fármacos com algum tipo de limitação (EVANGELISTA, 2006). A administração de fármacos pode ser facilitada pela utilização de sistemas de liberação nanoestruturados, que possuem a capacidade de proteger as moléculas ativas contra degradação em meio fisiológico, liberar controladamente a substância ativa no sítio de ação e permitir a administração de fármacos hidrofóbicos em sistemas dispersos aquosos. Outras propriedades também são significativamente melhoradas como a redução da dose e dos efeitos adversos e alterações no processo de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos (CARLUCCI & BREGNI, 2009; BEDIN, 2011).

A nanotecnologia farmacêutica e o seu emprego na medicina têm tido um elevado crescimento e, com o seu desenvolvimento, visa-se à criação de sistemas com propriedades e aplicações inovadoras, que estejam na escala nanométrica (10^{-9} m = 1 nm) (FERREIRA & RANGEL, 2009). Dentre os exemplos de sistemas de liberação nanoestruturados existentes, podem-se citar as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas sólidas, os lipossomas, as microemulsões, as micelas e os dendrímeros (DEVALAPALLY, CHAKILAM & AMIJI, 2007).

As microemulsões são bastante relevantes e surgem como um interessante sistema para este trabalho, pois funcionam como um sistema transportador de fármacos, que compartimentalizam a substância ativa e as direcionam para os sítios onde deverão exercer o efeito farmacológico (OLIVEIRA, 1992; HARWOOD ACADEMIC, 1998).

Por volta dos anos de 1940, foi introduzido o conceito de microemulsão por Hoar & Schulman (1943) ao descreverem a produção de uma solução transparente e translúcida, a partir da titulação de uma emulsão com hexanol. Mas, apenas no final dos anos de 1950, Schulman; Stoeckenius & Prince (1959) estabeleceram o conceito de microemulsão que vem sendo definido e redefinido de acordo com os avanços tecnológicos (GOMES, 2010).

As microemulsões (ME) são sistemas, geralmente, constituídos de água, óleo, agente tensoativo e, algumas vezes, cotensoativo. Diferentemente das emulsões, as microemulsões são sistemas transparentes, de baixa viscosidade, que contêm altas concentrações de óleo e água, estabilizados por tensoativo, podendo este ser

associado a cotensoativos (WUTTIKUL & BOONME, 2016). Elas são formadas espontaneamente quando os componentes são misturados nas concentrações adequadas (LEANPOLCHAREANCHAI *et al*, 2014). Já as emulsões se caracterizam por serem dispersões grosseiras bifásicas, turvas ou leitosas, termodinamicamente instáveis e que necessitam de uma energia externa para sua formação (TENJARLA, 1999).

As microemulsões possuem sua principal aplicação nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, têm sido utilizadas com bastante relevância na tecnologia farmacêutica e possuem grandes vantagens em relação às emulsões (MENDONÇA, 2005):

- Podem ser preparadas de maneira simples, possuem estabilidade termodinâmica e são mais baratas que as emulsões;
- São sistemas transparentes, podendo ser detectado facilmente qualquer precipitado ou heterogeneidade;
- O efeito estabilizador dos tensoativos melhora a estabilidade dos fármacos;
- Podem ser utilizadas para soluções injetáveis a depender do tensoativo compatível;
- Possuem uma taxa elevada de difusão e penetração na pele e mucosas comparada às formulações convencionais.

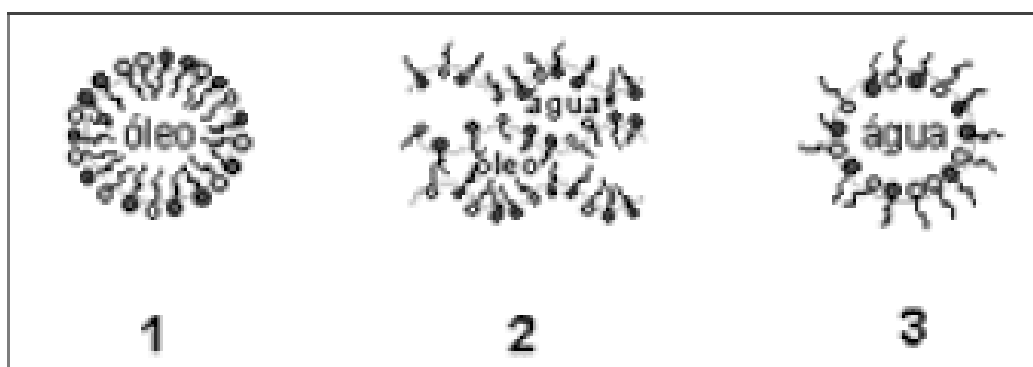
Essa elevada taxa de difusão pode ser justificada pelo tamanho das gotículas das microemulsões, que é muito reduzido, aproximadamente 100 vezes menos que as gotículas da emulsão, o que faz com que o sistema também se torne isotrópico, não espalhe a luz, porque possui um diâmetro médio das gotículas menor que $\frac{1}{4}$ da luz incidente (PESTANA, 2009).

As microemulsões podem ser classificadas em três tipos (Figura 4): óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) ou bicontínua (CUNHA JÚNIOR *et al*, 2003; NICOLETTI & FRASSON, 2006; SAHOO, PANI & SAHOO, 2014), como segue abaixo:

- a) óleo/água: apresentam uma fase aquosa contínua, com gotículas de óleo dispersas, as quais estão recobertas pelo tensoativo. Neste caso, ocorrem gotículas, cuja cabeça polar do tensoativo é voltada para a fase contínua aquosa e a cauda apolar se dirige para o interior hidrófobo (GOMES, 2010).

- b) água/óleo: apresentam gotículas de água recobertas com tensoativos dispersas em uma fase oleosa contínua. Neste caso, formam as gotículas inversas, em que as moléculas anfifílicas nas membranas são orientadas com a parte lipofílica voltada para o óleo e a parte hidrofílica voltada para a água (GOMES, 2010).
- c) bicontínuas: neste caso, os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos formam microemulsão com estrutura bicontínua, com uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa e uma rede de tubos oleosos em matriz aquosa. Esse tipo de microemulsão pode transportar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (GOMES, 2009).

Figura 4 – Representação esquemática dos tipos de microemulsão.



Fonte: CUNHA JÚNIOR *et al* (2003).

Nota: 1- ME óleo em água 2- ME bicontínuas 3- ME água em óleo

Existem vários fatores que podem determinar qual o tipo de microemulsão será formada: o tipo de tensoativo, cotensoativo e óleo, a razão de água / óleo, a temperatura e a presença de íons na fase aquosa (JONSSON *et al*, 1998).

A escolha do tensoativo é muito importante para determinar o tipo de microemulsão formada. Por isso, é essencial conhecer as características dos tensoativos utilizados, analisando suas propriedades e observando em qual aplicação será utilizado. O tensoativo pode ser utilizado puro ou em mistura com outros componentes, tendo o objetivo de produzir microemulsões estáveis através da diminuição da tensão interfacial.

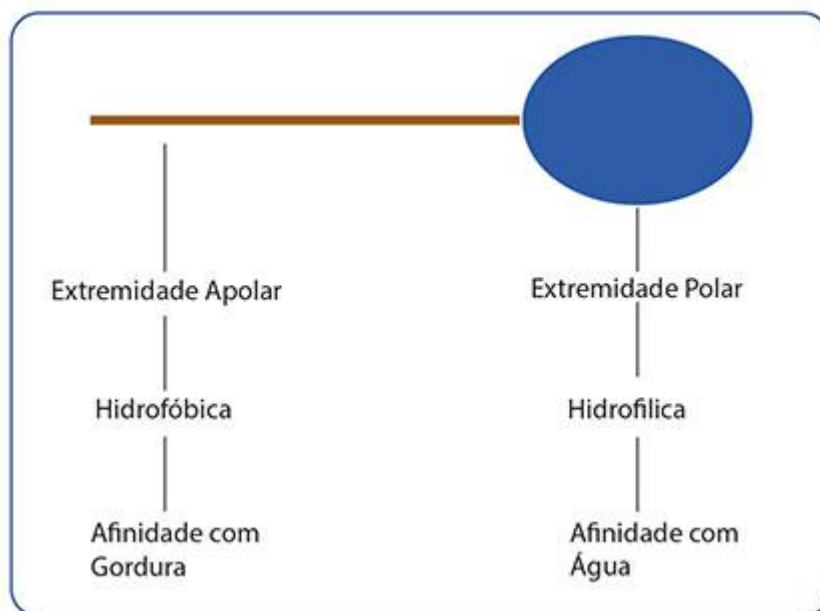
Essa redução da tensão interfacial permite a formação de um filme interfacial fluido, composto por moléculas de tensoativos. Geralmente, é necessária a adição de um cotensoativo para que esse filme se torne mais flexível e alcance valores de

tensão inferiores a 1mN/m. Com essa adição de cotensoativo, pode ocorrer um aumento na estabilidade e na região de ocorrência de microemulsão (FENG-FENG; LI-QIANG & CHEN-HO, 2005; GOMES, 2010).

2.4 TENSOATIVOS

Os tensoativos são substâncias que, quando presentes em um sistema, têm a capacidade de adsorver na superfície (interface em que uma fase é gasosa) ou na interface (fronteira entre duas fases imiscíveis) e alterar sua energia livre (ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Eles possuem uma natureza anfifílica, ou seja, possuem uma região hidrofóbica, que possui afinidade por solventes apolares e uma região hidrofílica, que tem afinidade por solventes polares conforme se observa na Figura 5. A região hidrofóbica pode ser formada por cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas, ou, em poucos casos, anéis aromáticos. A outra região, que é a hidrofílica, pode ser aniônica, catiônica, anfótera e não-iônica (ROSSI *et al*, 2007).

Figura 5 – Esquema ilustrativo de uma molécula de tensoativo



Fonte: Blog da LabNews – Soluções em limpeza de materiais¹

¹ Disponível em: <http://www.midiaslabnews.com.br/blog/a-importancia-do-tensoativo-na-formulacao-do-detergente-enzimatico>. Acesso em 30/05/2016.

Em decorrência dessas características, os tensoativos possuem uma grande importância e podem ser utilizados com bastante versatilidade nos muitos processos tecnológicos. Podem desempenhar diferentes funções como: emulsificante, lubrificantes, agente farmacêutico, cosméticos, plásticos, inibidores de corrosão, entre outras (ROSSI *et al*, 2006).

Os tensoativos são classificados de acordo com a região hidrofílica, como segue abaixo:

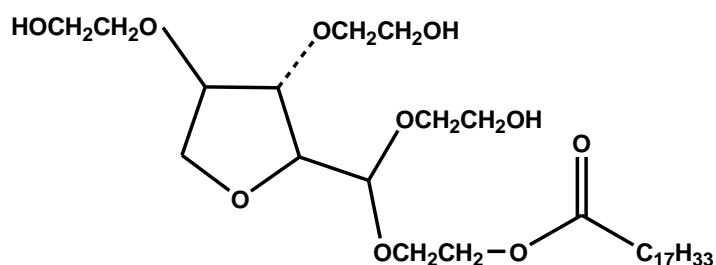
- a) tensoativos iônicos: em solução aquosa, se dissociam, formando íons carregados negativamente (tensoativos aniônicos) ou positivamente (tensoativos catiônicos);
- b) tensoativos não-iônicos: quando em contato com solução aquosa, não fornece íons e a sua solubilidade em água se deve à presença, em suas moléculas, de grupamentos funcionais que possuem forte afinidade pela água;
- c) tensoativos anfóteros: em condições normais, contêm tanto carga aniônica quanto catiônica.

A escolha do tensoativo utilizado pode ser analisada através do Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do mesmo. Griffin, em 1948, determinou o conceito de EHL, no qual ele classificou em uma escala de 1 a 50, onde o valor de EHL aumenta conforme a hidrofília da substância. O valor do EHL pode classificar os tensoativos. Aqueles que apresentam EHL muito baixo ou menor que 3 são denominados lipofílicos. Os que apresentam EHL entre 3 e 9 apresentam propriedades emulsificantes, dando origem a microemulsões do tipo A/O. Substâncias com EHL entre 9 e 16 apresentam características hidrofílicas, originando emulsões do tipo O/A. Já as que possuem EHL acima de 16 apresentam características exacerbadamente hidrofílicas, atuando como solubilizantes (PRISTA *et al*, 1990; BARROS, 2013).

Os óleos e as substâncias também possuem valores de EHL e, a depender da composição e do tipo de emulsão formada, a esses também se podem atribuir um valor de EHL. Esse valor é utilizado para orientar na escolha do tensoativo utilizado, que deve ter um EHL próximo ao do óleo e, quando utilizado em combinação com outros tensoativos possui um EHL resultante desta mistura (ANSEL; POPOVICH & ALLEN JÚNIOR, 2000; BARROS, 2013).

Um tipo de tensoativo bastante utilizado é o tween 80 (polissorbato 80), geralmente empregado na produção farmacêutica, devido ao baixo custo e toxicidade reduzida. É um tensoativo não-iônico, proveniente do sorbitano polietoxilato e ácido oleico e sua estrutura química está representada na Figura 6. A característica hidrofílica da cadeia de polioxietileno faz do tween, tensoativo hidrofílico, geralmente solúvel ou dispersivo em água, empregado na obtenção de microemulsões do tipo óleo em água (O/A) (WEISZHÁR *et al*, 2012; BRAUN *et al*, 2015).

Figura 6 – Estrutura química do Tween 80 (Polissorbato)



Fonte: MARTINI (2005).

Na estabilização de sistemas dispersos do tipo microemulsão, também são descritos os cotensoativos, responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões. Além disso, promove fluidificação do filme interfacial formado pelo emulsionante, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema obtido. Os principais cotensoativos utilizados no preparo de microemulsões são álcoois e glicóis de baixa massa molecular, que apresentam uma cadeia carbônica entre dois e dez carbonos (CUNHA JÚNIOR *et al*, 2003, BEDIN, 2011).

A literatura mostra que a adição de um cotensoativo diminui o tamanho das gotículas e amplia as regiões de microemulsões (OLIVEIRA *et al*, 2004). Dessa forma, o tamanho da gotícula é extremamente afetado pela mistura de tensoativo e cotensoativo no sistema, havendo tendência à diminuição do tamanho das gotículas com o aumento da sua concentração, gerando um sistema opticamente transparente ou translúcido. Isso ocorre porque a mistura de tensoativo com um cotensoativo é mais eficiente em reduzir a tensão interfacial entre óleo-água, proporcionando a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna. Como exemplos desses

cotensoativos, descritos na literatura, tem-se o etanol absoluto, álcool isopropílico e o propilenoglicol (FORMARIZ *et al*, 2005; ROSEN & KUNJAPPU, 2012).

Quando uma molécula com estrutura anfipática é dissolvida num solvente aquoso, o grupo hidrofóbico orienta-se de modo a minimizar o contato com as moléculas de água. A superfície de água fica coberta por uma camada de tensoativo, com os seus grupos hidrofóbicos voltados para o ar. Dessa forma, ocorre uma diminuição da tensão superficial da água (ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Se a concentração do tensoativo em solução for aumentada, as moléculas que estão no seio da solução se associam, formando micelas, de forma a diminuir a energia do sistema (MYERS, 1999).

As micelas são agregados moleculares, que possuem regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais se associam espontaneamente em solução aquosa, a partir de certa concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC). Elas podem ser usadas como microrreservatórios hidrossolúveis biocompatíveis para a liberação de fármacos hidrofóbicos pouco solúveis (SINKO, 2008).




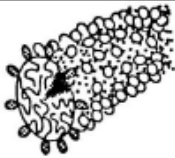

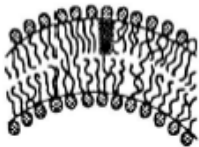
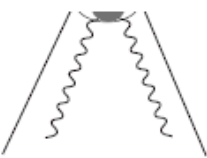
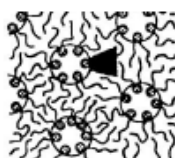
Essas micelas podem apresentar diferentes tipos de agregados, que podem ser determinados pela análise geométrica da molécula, a qual é definida pelo fator de empacotamento, conforme a equação abaixo (MYERS, 1999; GALGANO, 2012):

$$f = \frac{V}{A.L}$$

Onde: V – volume da cadeia hidrofóbica
 A- Área seccional por cabeça polar do tensoativo
 L – comprimento da cadeia hidrofóbica

De acordo com esse fator de empacotamento, os diferentes agregados são formados em conformidade com a Figura 7 que segue.

Figura 7 – Estruturas previstas de agregação das micelas de acordo com o fator de empacotamento

Fator de empacotamento, f	Formato de empacotamento	Estrutura formada	Imagem pictorial
$f < 1/3$		Micelas esféricas	
$1/3 < f < 1/2$		Micelas cilíndricas	
$1/2 < f < 1$		Estruturas lamelares: bicamadas planares ou flexíveis	
$1 < f$		Micelas reversas	

Fonte: HIEMENZ & RAJAGOPALAN (1997).

2.5 DIAGRAMAS DE FASE

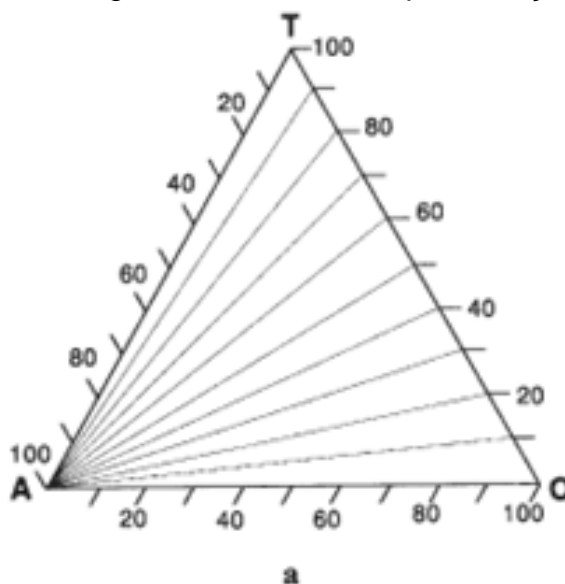
Os diagramas de fase (DF) podem ser descritos como ternários (DFT) (formados por três constituintes) ou pseudoternários (DFPT) (formado por mais de três constituintes) e são representados por triângulos equiláteros, cujos lados são usados como eixos, correspondendo aos constituintes. Geralmente, a proporção de cada componente é representada como porcentagem de peso total da formulação e, assim, cada vértice corresponde a 100% do componente indicado. Desta forma, os diagramas são ferramentas capazes de identificar cada região e facilitar o trabalho dos pesquisadores (BORBA & SANTANA, 2007; CARVALHO, 2009; SILVA *et al*, 2009).

A construção de diagramas de fase é uma ferramenta fundamental para a obtenção de sistemas microemulsionados, pois descreve em que condição experimental é possível se obter as regiões limites de transição entre emulsões, as separações de fases e as microemulsões O/A e A/O (OLIVEIRA *et al*, 2004; SYED &

PEH, 2014). Geralmente, as microemulsões são formadas por quatro componentes (água, óleo, tensoativo e cotensoativo), o que torna apropriada a utilização do diagrama de fases pseudoternário DFPT, que difere do diagrama ternário convencional pelo fato de o tensoativo e o cotensoativo estarem agrupados como um único componente (GUIMARÃES, 2013).

Segundo Oliveira *et al* (2004), os diagramas de fase geralmente são construídos através de titulações preparando misturas binárias dos componentes e titulando com a terceira fase, como segue: pode-se associar a mistura emulsiva (T) com o óleo (O) e titular com a fase aquosa (A) ou associar a mistura emulsiva com a fase aquosa (A) e titular com a fase oleosa (O). Na Figura 8, está representada a titulação feita com a fase aquosa, na qual as linhas traçadas são direcionadas ao infinito da fase aquosa (representa 100% de fase aquosa).

Figura 8 – Ilustração de um diagrama de fases feito por titulação com a fase aquosa.



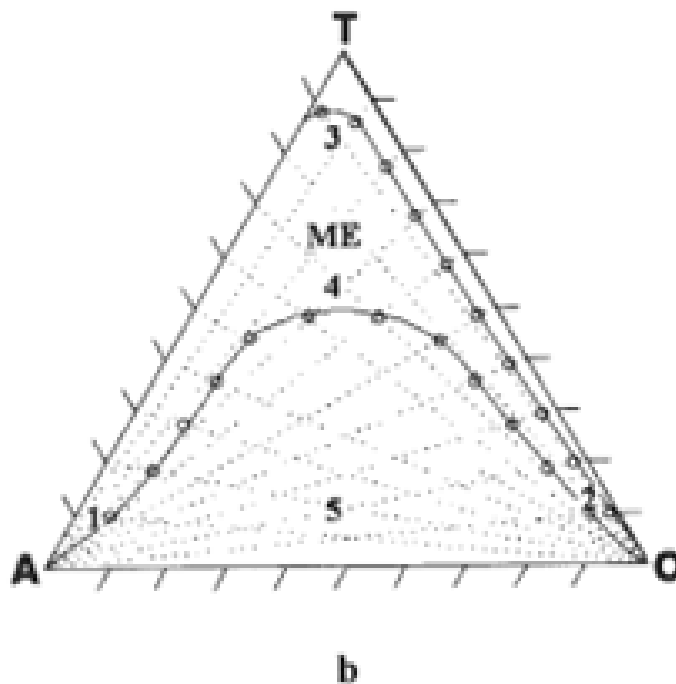
Fonte: OLIVEIRA *et al* (2004).

Oliveira *et al* (2004) mostram também a descrição das regiões obtidas em um diagrama de fase, representada na Figura 9, em que as microemulsões representam a existência de um sistema opticamente transparente representado pela região ME.

De acordo com os autores, as regiões de 1 a 5 descrevem os diferentes tipos de sistemas, onde na região 1 a concentração de tensoativo é baixa e existe uma elevada quantidade de água, predominando a formação de microemulsão O/A. A região 2 possui uma grande quantidade de fase oleosa e pouca de água e

tensoativo, predominando a formação de microemulsão A/O. A região 3 e 4 é intermediária e possuem sistemas correspondentes a fases bicontínuas onde ocorre a passagem paulatina de um sistema O/A para A/O e vice-versa. A região 5 é descrita como muito instável onde pode ocorrer separação entre as fases aquosas e oleosas.

Figura 9 – Representação dos pontos de titulação e regiões do diagrama de fases



Fonte: OLIVEIRA *et al* (2004)

2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Diversas técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de caracterizar sistemas microemulsionados. Dentre elas, pode-se citar a microscopia de luz polarizada, utilizada para verificar a isotropia do sistema; o espalhamento dinâmico de luz, utilizado para medir o diâmetro da gotícula ou fase dispersa; a reologia, para verificar as propriedades reológicas do sistema e outros métodos mais corriqueiros como densidade e condutividade elétrica (SADURNÍ *et al*, 2005; MASON *et al*, 2006; BEDIN, 2011).

2.6.1 Microscopia de Luz Polarizada

Através da microscopia de luz polarizada (MLP), é possível avaliar estruturas isotrópicas dos sistemas microemulsionados. Na MLP, um microscópio comum, junto a um condensador e acoplado a um polarizador orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano (ABRAMOWITZ, PARRY-HILL & DAVIDSON, 2005).

As alterações que uma substância birrefringente provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (ABRAMOWITZ, PARRY-HILL & DAVIDSON, 2005; ZHENG *et al*, 2011).

Alguns cristais líquidos exibem estruturas anisotrópicas e, com isso, são obtidas imagens características do tipo de fase formada. Por exemplo, a fase lamelar pode ser identificada através da visualização das “cruzes de malta” e a fase hexagonal, através da presença de estrias ou estruturas parecidas com fibras. Já as estruturas isotrópicas, como as microemulsões, por não desviarem a propagação da luz polarizada, são visualizadas como campo escuro (CARVALHO, 2009).

2.6.2 Condutividade Elétrica

A técnica da condutividade elétrica é utilizada para verificar mudanças estruturais nas microemulsões. Através do volume da fração aquosa das microemulsões, pode-se observar um aumento na condutividade elétrica. Geralmente em sistemas com até 30% da fase aquosa, a condutividade é inicialmente baixa, sugerindo a existência de estruturas reversas em meio oleoso não condutor (A/O).

Nos casos de a fase aquosa ser estabelecida entre 30 e 70%, o aumento na condutividade não é linear, indicando a formação de estruturas bicontínuas. Acima de 70% de fase aquosa, a condutividade aumenta linearmente, indicando a formação de estruturas O/A (ROSSI *et al*, 2007).. Assim, a condutividade das microemulsões pode auxiliar bastante na determinação do tipo de microemulsão formada em um sistema (SRIPRIYA *et al*, 2007).

2.6.3 Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios-X pode ser dividida em espalhamento de raios-X a altos ângulos (WAXS – wide-angle X-ray scattering) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS – small-angle X-ray scattering). Ambas não apresentam diferenças físicas fundamentais. Entretanto, em experimentos de SAXS, os ângulos de espalhamento acessados são menores, o que possibilita a caracterização de materiais em uma escala de comprimento consideravelmente maior (KELLERMANN, 2003; FRANZINI, 2006).

A utilização da técnica de Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas microemulsionados é importante, devido à possibilidade de se determinar o tamanho médio, a forma e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas líquido-cristalinas (CARVALHO, 2009).

Na técnica de SAXS, um feixe de raios-X de luz monocromática (luz visível, raio x, nêutrons, elétrons), com comprimento de onda variável é incidido sobre uma amostra e o espalhamento gerado neste caso é coletado, na maioria das vezes, por um detector bidimensional. No experimento, o número de fótons como função do ângulo de espalhamento é medido. Esse espalhamento é possível devido às heterogeneidades das densidades eletrônicas das estruturas do sistema (CARVALHO, 2009).

No caso de sistemas diluídos, as partículas estão distantes umas das outras e não interagem entre si fazendo com que a intensidade espalhada seja descrita pelo fator de forma $P(q)$. Sistemas formados pela associação de água, óleo, estabilizados por tensoativos abaixo da CMC, pode ter a intensidade obtida pelo SAXS similar à observada em partículas diluídas ou monodispersas.

Já para sistemas concentrados, são muitas as partículas espalhadoras que interagem entre si e, neste caso, o espalhamento medido refletirá sua geometria e arranjo. Em sistemas nos quais a concentração de tensoativos é maior que a CMC, ocorre interação entre as moléculas de tensoativos em diversos graus de organização. Segundo Formariz *et al* (2007), o padrão de espalhamento poderá ser similar ao observado em partículas dispersas numa matriz homogênea. Neste caso, a intensidade espalhada é descrita na equação abaixo

$$I(q) = N \cdot P(q) \cdot S(q)$$

Onde:

$P(q)$ – fator de forma

$I(q)$ – intensidade do espalhamento

N – número de objetos espalhadores

$S(q)$ – fator de estrutura do conjunto

Através da técnica do SAXS, pode-se deduzir uma distância média d , entre duas gotículas, tomando como base o valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima (q_{\max}):

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}}$$

Essa técnica é interessante para a caracterização de sistemas nanoestruturados, pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como micelas e microemulsões. Ela também permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores, mesmo que estes não estejam organizados. Além disso, caracteriza materiais que têm distância entre objetos espalhadores maiores que o limite de trabalho da difração de raios-X e partículas com tamanho entre 1 e 100nm (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1995; CARVALHO, 2009).

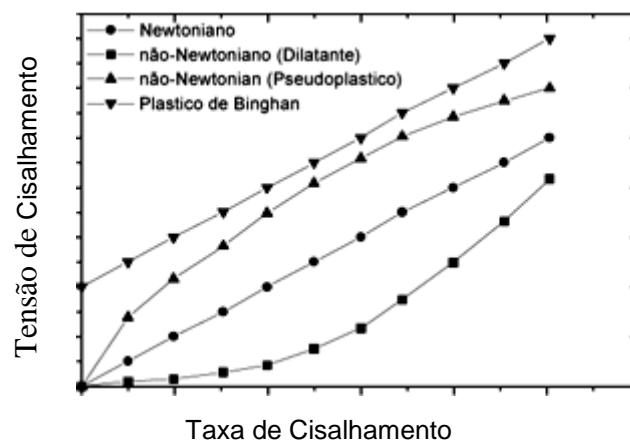
2.6.4 Reologia

A reologia é útil para avaliar sistemas microemulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (FORMARIZ *et al*, 2005). As determinações das características reológicas são usadas para caracterizar o comportamento mecânico dos fluidos, a facilidade com que o material pode ser vertido de um frasco, ser apertado em um tubo, manter a forma do produto num frasco ou, após a extrusão, esfregar o produto sobre a pele (KLEIN, 2007).

Segundo Sinko (2008), viscosidade é a resistência ao fluxo por parte de um líquido. Quanto maior a viscosidade, maior é a resistência de um líquido. A reologia estuda a deformação e fluidez dos materiais sob a influência de forças externas. Tecnicamente, é definida como “a resistência ao fluxo ou ao movimento” (ANTONIO, 2007).

As medidas reológicas provêm informações sobre a estabilidade física e a consistência da microemulsão. Diferentes forças agem sobre os materiais, em função das condições de estocagem, processamento ou condições de aplicação e a resultante destas forças pode modificar o comportamento reológico destes materiais (ANTONIO, 2007; SANTIS, 2008). Nos estudos de reologia, os fluidos recebem classificação que compõem os sistemas, denominando-os de newtonianos e de não-newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não-newtoniano (MORAES, 2008), que pode ser: pseudoplástico, plástico e dilatante (Figura 10).

Figura 10 – Representação de Curvas Reológicas demonstrando os 4 tipos de classificação reológica dos fluídos



Fonte: FONTES (2000).

Os fluidos não-newtonianos são aqueles que não apresentam uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, isto é, os valores da viscosidade mudarão com a variação nos valores da taxa de cisalhamento. Quando os valores da viscosidade diminuem com o aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento pseudoplástico. Quando o contrário acontece, ou seja, a viscosidade aumenta com aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento dilatante. Já os fluidos plásticos necessitam de uma

tensão finita, conhecida como tensão de escoamento ou “yield stress”, para que ocorra movimento das partículas (FERREIRA *et al*, 2005; SINKO, 2008).

O fluxo classificado como newtoniano é aquele em que a curva de fluxo gera uma reta que passa pela origem, no qual todos os pares de valores de taxa e tensão de cisalhamento pertencentes a esta reta são constantes, o que significa que a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento. Portanto, a viscosidade desse tipo de fluxo é constante (SCHRAMM, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas microemulsionados, contendo o óleo essencial de *L. gracilis* como fase oleosa e analisar sua potencial ação amebicida frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de *L. gracilis*;
- Obter as microemulsões contendo óleo essencial de *L. gracilis* a partir do diagrama de fases pseudoternário;
- Caracterizar os sistemas obtidos;
- Verificar a citotoxicidade das microemulsões obtidas em células de cultura de mamíferos.
- Determinar a IC50 das microemulsões obtidas sobre os trofozoítos de *A. castellanii*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Tween 80 como tensoativo;
- Propilenoglicol como cotensoativo;
- Água purificada obtida a partir de sistema Milli-Q®;
- Óleo essencial de *L. gracilis* (OELG)
- Meio de cultura PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedura e 1,8% de glucose);
- Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*,
- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio)
- DMSO (sulfóxido de dimetilo)

4.2 EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS

- Agitador magnético (FISATOM®);
- Balança analítica (DENVER® APX 200);
- Clevenger modificado;
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa, (Shimadzu QP 5050 A);
- Microscópio de luz polarizada (Olympus modelo BX51);
- Reômetro Anton Paar (MCR -302);
- Pipeta de Pasteur;
- Pipetas graduadas de 1,0 ml a 10,0 ml;
- Bequês de 5,0 ml a 150 ml;
- Tensiômetro Attension da Biolim Scientific (Sigma 700);
- Provetas 20ml;
- Placas de 24 e 96 poços de cultura de tecidos (TPP®);
- Câmara de Neubauer,
- Microscópio óptico.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Extração do óleo essencial de *L. gracilis*

As folhas de *L. gracilis* foram obtidas no Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe. No processo de extração, foram utilizados 400g de folhas as quais foram secas à 40 ± 1 °C, em um forno com circulação de ar por cinco dias. As folhas foram trituradas em um triturador para aumentar a área de contato com a água no momento da extração. O pó das folhas foi colocado em um equipamento extrator do tipo Clevenger modificado por um período de 3 horas a temperaturas abaixo de 60 °C. Foram utilizados 2 litros de água para cada 100g de folha e destilados no balão volumétrico acoplado ao aparelho. O óleo essencial obtido foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado sob refrigeração (RESENDE, 2013).

4.3.1.1 Determinação da densidade do óleo

Para a determinação da densidade de massa (ρ), o picnômetro de 2 ml foi pesado a 20°C e, após limpo e seco, seu valor foi registrado. Posteriormente, o mesmo picnômetro foi pesado com água destilada na mesma temperatura e seu valor também foi registrado. Por último, foi pesado com o óleo essencial.

O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada (d_{20}^{20}) determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. Após a determinação da densidade relativa, foi calculada a densidade de massa (ρ) do óleo essencial que foi próximo de 0,93g/ml (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

4.3.1.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas CG/EM/DIC (GCMSQP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com um amostrador com injeção automática AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano) 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 mm de espessura de filme, em um fluxo constante de

Hélio 5.0, com taxa de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura de injeção foi de 280 °C, 1,0 µL (10 mg mL⁻¹), com uma razão de split de 1:30. A programação de temperatura do forno iniciou-se a partir de 50 °C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C min⁻¹, até 200 °C, em seguida, a 10 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 5 min. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1000 u/s; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. A análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (COSTA, 2010).

4.3.2 Análise da Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica

A tensão superficial é uma propriedade muito importante dos líquidos, em especial, da água. Ela é fundamental para os sistemas biológicos e químicos tais como membranas biológicas e produtos químicos (HENN, 2003). Neste estudo, a tensão superficial da água foi analisada com o objetivo de avaliar a influência do propilenoglicol no comportamento do tween 80 como tensoativo, determinando a concentração micelar crítica (CMC) do tween isolado e misturado com o propilenoglicol em várias concentrações.

Para realizar a determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC), foi utilizado o aparelho Tensiômetro Attension (Sigma 700), à temperatura ambiente, para a determinação da tensão superficial. Durante a medição, a placa de Wilhelmy foi submersa nas amostras e o tensiômetro mediu a força de empuxo do líquido sobre a placa, calculando, assim, a tensão superficial através do tamanho da placa conhecida. Para a realização do experimento, a água foi utilizada como padrão e sua tensão superficial foi previamente medida.

Para a obtenção das amostras, foi preparada uma solução aquosa inicial de 0,5g/l para o tensoativo tween e para as misturas tween: propilenoglicol 1:1 e 2:1 e, a partir destas soluções, foram realizadas 10 diluições para cada solução com concentrações próximas à CMC do tween. Então, foi realizada a leitura no equipamento, que foi feita em triplicata, para cada diluição. Com os dados das tensões superficiais obtidos, foi plotado um gráfico para a determinação da CMC. As

medidas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (Labam) da Universidade Federal de Sergipe (FERREIRA, 2014).

4.3.3 Obtenção das microemulsões através de diagrama de fases pseudoternário

As microemulsões foram preparadas através da construção dos diagramas de fase pseudoternários. Os diagramas foram compostos pelos seguintes componentes: tween 80, propilenoglicol, água e óleo essencial de *L. gracilis*. O tensoativo e o cotensoativo utilizados foram combinados na razão de 1:1 e 2:1 e misturados por 30min.

À mistura de Tensoativo/Cotensoativo (T/Co-t) na proporção de 1:1 e 2:1 foi acrescentada a fase oleosa e homogeneizada por agitação magnética, à temperatura ambiente por mais 30min, nas seguintes proporções de fase oleosa e mistura de tensoativo e cotensoativo: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, onde cada proporção corresponde a um ensaio, formando, assim, 9 ensaios. Em cada ensaio foram feitas titulações com água purificada ultrapura Mili-Q, acrescentando 500µl gota a gota, sob agitação magnética e registrando as mudanças de aspecto visual a cada 3 minutos.

4.3.4 Caracterização dos Sistemas

4.3.4.1 Microscopia de luz Polarizada

A identificação da isotropia nos sistemas obtidos através da titulação nos diagramas de fase pseudoternários foi realizada por MLP (Olympus modelo BX51), equipado com uma câmera digital (Evolution LC Color) e Software analisador de Imagem (Pixel Link), depois de percorrido o tempo mínimo de cinco dias para o equilíbrio dos sistemas e as medições feitas à temperatura ambiente (25°C). Para a realização do experimento, foi colocada uma gota de cada amostra em uma lâmina de vidro, coberta por uma lamínula e analisada sob luz polarizada. O teste foi realizado no Laboratório Multiusuário do Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe (CARVALHO, 2009).

4.3.4.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica dos sistemas foi avaliada por meio de condutivímetro digital (PHOX- C1000), previamente calibrado com solução de calibração apresentando condutância de $146,9 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, à temperatura de $25 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (REIS, 2014). O teste foi realizado no Laboratório de Nanotecnologia e Nanomedicina (LNMed) da Universidade Tiradentes (UNIT).

4.3.4.3 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

O arranjo estrutural das microemulsões foi analisado a partir de medidas de SAXS à temperatura ambiente. Os dados foram coletados em uma estação de medidas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP, na estação D11A, equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de $1,499\text{\AA}$. A intensidade de espalhamento $I(q)$ foi expressa em unidades arbitrárias e o espalhamento de ar parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído da intensidade total da amostra (CARVALHO, 2009; RESENDE, 2013).

4.3.4.4 Reologia

A determinação reológica foi realizada em um reômetro AR2000ex da TA Instruments e as formulações foram avaliadas a uma temperatura controlada de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram aplicadas na placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo de cisalhamento e permitindo um tempo de repouso de 1min antes de cada determinação. Cada corrida teve duração de 4 minutos. O tipo de geometria utilizada para as análises foi tipo cone/placa (CP) com 50 mm de diâmetro, 1° ângulo do cone e 30 mm de espaçamento entre o cone e a placa. Os dados foram ajustados com o modelo da lei de Newton através do software OriginPro v.8.

4.3.4.5 Tamanho de gotícula e índice de polidispersão

Para determinar o tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersão, foi realizada a técnica do Espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o

equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas em água Mili-Q e aproximadamente 1000µl de amostra foram inseridas em cubeta apropriada para a realização das medidas a uma temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra. Foram utilizados como parâmetros de medida os índices de refração do meio dispersante, água (IR= 1,33) (GALVÃO, 2015)

4.3.5 Citotoxicidade sobre células de cultura de mamíferos

O método MTT foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico do óleo essencial de *L. gracilis*, da mistura do tween com o propilenoglicol na proporção 1:1 e da microemulsão em fibroblastos (L929) nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 150 µg/ml. Os resultados dos testes foram expressos em percentual de viabilidade. Para classificar a citotoxicidade dos compostos foi utilizada a escala de intensidade baseada em Rodrigues *et al* (2014).

A atividade citotóxica das amostras testadas foi realizada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio). Os fibroblastos foram mantidos em meio de cultura DMEM, suplementada com 10% de soro total bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina, GIBCO). As células (1 x 10⁵ células totais) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Depois de 24 horas, 10µl das amostras foram adicionadas a cada poço na concentração final de 50µg/ml.

O fármaco doxorrubicina (5µg/ml) foi utilizado como controle positivo. Após 72 horas, 25µl da solução de MTT (5mg/ml) foi adicionada a cada poço e a mistura foi incubada por mais 3 horas. Ao fim desse tempo, o meio de cultura com excesso de MTT foi aspirado e 100µl de DMSO foram adicionados a cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de formazan. A densidade ótica (DO) dos poços foi medida a 570nm.

4.3.6 Determinação da atividade amebicida

Para a realização desse estudo, foram usados trofozoítos de *A. castellannii* (cepa de procedência clínica isolada de lesão de ceratite amebiana), os quais foram

mantidos no laboratório de Parasitologia e Entomologia Tropical da Universidade Federal de Sergipe, em meio PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedura e 1,8% de glucose), à temperatura ambiente.

Para determinar o potencial amebicida, 8×10^4 trofozoítos de *A. castellanii*, em fase logarítmica de crescimento (48 a 72 horas de cultura) foram distribuídos em placas de 24 poços de cultura de tecidos (TPP®), contendo 2 ml de meio de cultura PYG por poço. Os parasitos foram expostos às formulações selecionadas. Cada formulação foi avaliada em triplicata e todas as experiências foram realizadas três vezes.

Vinte e quatro horas após o tratamento, as placas foram colocadas em gelo durante 40 minutos, homogeneizadas e uma alíquota de 12 µl foi analisada em câmara de Neubauer para contagem das amebas.

Para calcular a concentração de microemulsão que resultou em 50% de inibição de crescimento das amebas (IC₅₀), foi utilizado o programa Microsoft Excel, utilizando as percentagens de viabilidade celular e inibição do crescimento, calculada a partir dos resultados de contagens de câmara de Neubauer (SANTOS *et al*, 2016).

4.3.7 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram utilizados nas análises das atividades amebicidas. Foram realizados os testes de ANOVA de medidas repetidas para comparar as concentrações e verificar se há diferença significativa entre as médias. Havendo diferença, utilizou-se o teste Post Hoc de BONFERRONI para verificar quais as concentrações que tiveram diferenças entre médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

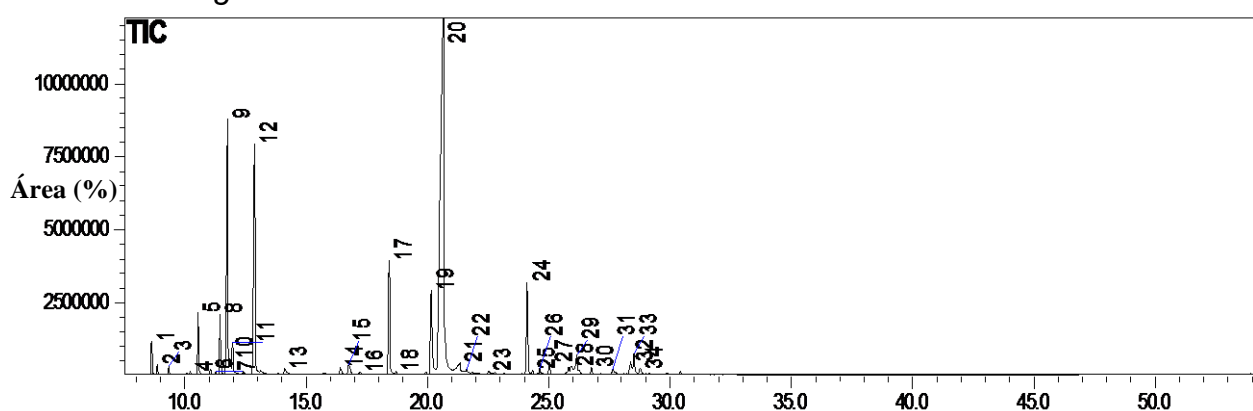
5.1 RENDIMENTO E DENSIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. GRACILIS*

O óleo obtido apresentou-se com coloração amarelo-pálida e seu rendimento médio foi de $2,5\% \pm 0,25$ (relação volume/massa), e está em concordância com a literatura, com descrição de teores de 0,43 a 7,99% (DIAS *et al*, 2015) e sua densidade foi de 0,93g/ml.

5.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. GRACILIS*

Na análise da composição química do óleo de *L. gracilis*, feita por cromatografia gasosa, foram identificados 34 componentes (Gráfico 1), pertencentes à classe dos terpenos. Os principais componentes estão demonstrados na Tabela 2.

Gráfico 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *L. gracilis* por cromatografia gasosa



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: 9. p-cimeno; 12. g-terpineno; 17. metil timol; 19. timol; 20. carvacrol e 24. (E)- cariofileno são os principais constituintes do óleo essencial de *L. gracilis*

Tabela 2 – Principais Constituintes Químicos do Óleo essencial de *L. gracilis* com suas respectivas porcentagens.

Componente	Al Calc	Al Lit	(Continua) %
p-cimeno	1017	1020	14,10
γ-terpineno	1050	1054	13,09

Componente	AI Calc	AI Lit	(Conclusão)
			%
metil-timol	1224	1232	4,26
timol	1281	1289	4,59
carvacrol	1297	1298	41,92
(E)-cariofileno	1418	1417	4,12

Fonte: O AUTOR (2016)

O Carvacrol foi o componente majoritário com 41,92%, seguido do p-cimeno com 14,10% e o γ -terpineno com 13,09%. Comparado a outros estudos, ocorre uma variabilidade dos componentes majoritários que, segundo Gomes, Nogueira & Moraes (2011), pode estar relacionado às condições genéticas, em função do local e das condições em que a planta foi cultivada.

De acordo com o estudo de Melo *et al* (2014), que analisaram os constituintes químicos de três genótipos de *L. gracilis*, essa variabilidade de componentes realmente foi comprovada. Em um genótipo, o timol foi o componente majoritário com 40,52%, em outro o carvacrol foi o majoritário com 45,84% e, por fim, no terceiro genótipo, o carvacrol também se apresentou como o composto principal, mas com 32,60%.

5.3 ANÁLISE DA TENSÃO SUPERFICIAL E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA

Na análise da tensão superficial, observa-se que, na maioria dos pontos, ocorreu um comportamento típico de queda da tensão superficial (Tabela 3) com o aumento da concentração de tensoativo, alcançando um certo ponto em que a tensão superficial se manteve praticamente constante. Segundo Pires (2002), após a CMC, a atividade do monômero permanece, praticamente, constante ou diminui um pouco. Consequentemente, não ocorre alta variabilidade na tensão superficial.

Tabela 3 – Valores da tensão superficial para as diluições do Tween 80 e do Tween 80 com o propilenoglicol 1:1 e 2:1

(Continua)		
TENSOATIVOS	CONCENTRAÇÃO	VALORES DA TENSÃO SUPERFICIAL
	g/L	mN/m
TWEEN 80		

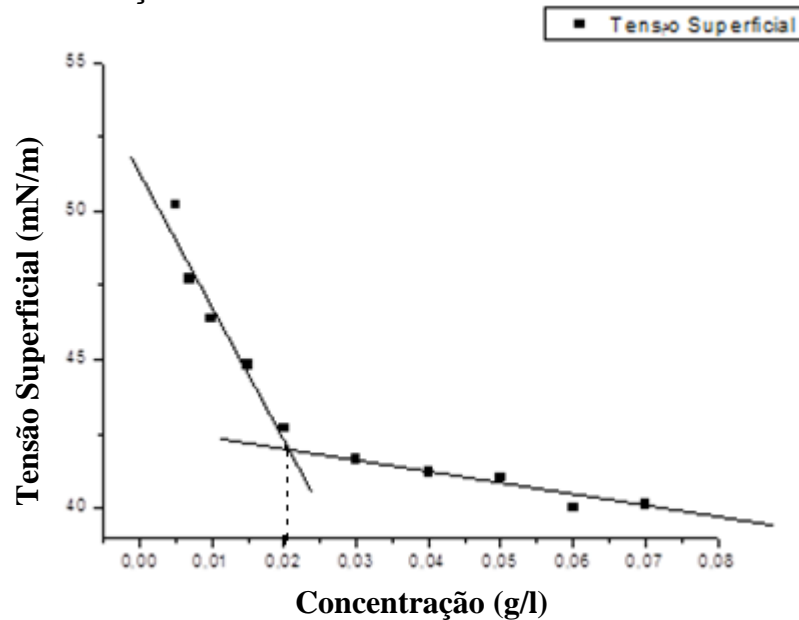
(Continua)

(Conclusão)		
TENSOATIVOS	CONCENTRAÇÃO	VALORES DA TENSÃO SUPERFICIAL
	g/L	mN/m
	0,005	50,210
	0,007	47,721
	0,01	46,370
	0,015	44,806
	0,02	42,672
	0,03	41,634
	0,04	41,183
	0,05	41,010
	0,06	39,997
	0,07	40,109
TWEEN 80 / PROPILENOGLICOL 1:1		
	0,005	53,837
	0,007	53,446
	0,01	51,822
	0,015	49,112
	0,02	48,011
	0,03	48,883
	0,04	48,693
	0,05	47,993
	0,06	47,798
	0,07	48,046
TWEEN 80 / PROPILENOGLICOL 2:1		
	0,005	52,040
	0,007	50,618
	0,01	46,909
	0,015	42,955
	0,02	41,825
	0,03	41,316
	0,04	40,433
	0,05	39,889
	0,06	39,909
	0,07	39,789

Fonte: O AUTOR (2016)

Nessa região, em que a tensão se manteve constante, infere-se ser a região da CMC. Seria nela que estaria ocorrendo a saturação de micelas. Os gráficos 2, 3 e 4 apresentam a região encontrada para a CMC.

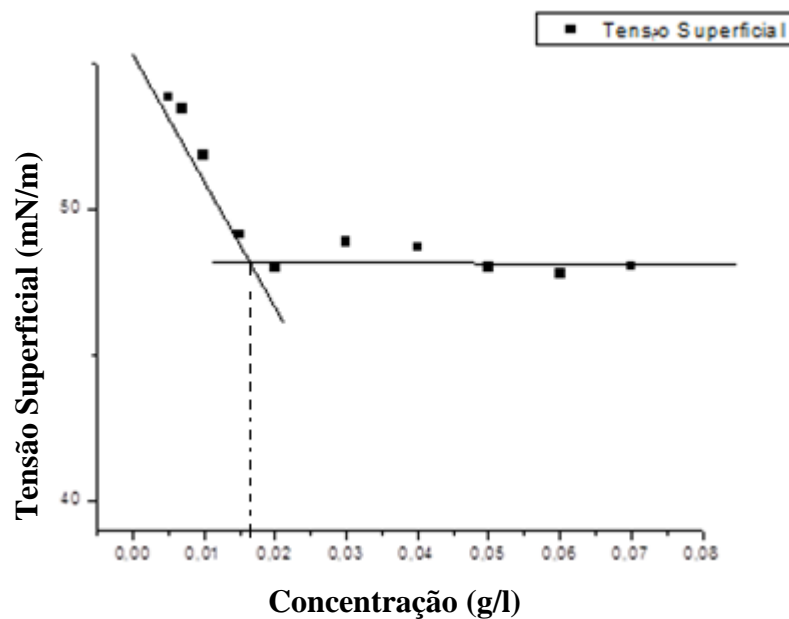
Gráfico 2 – Concentração micelar crítica do tween 80



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: valor da CMC 0,022 g/l

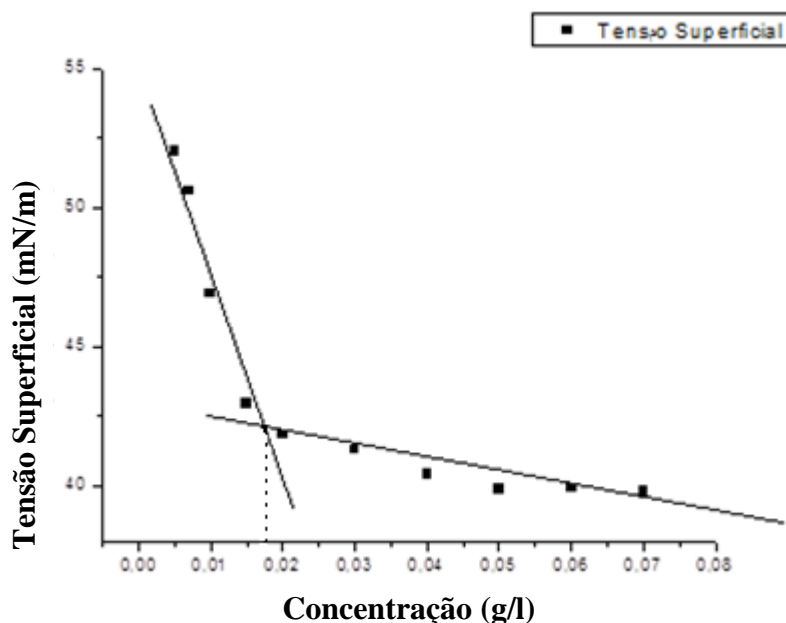
Gráfico 3 – Concentração micelar crítica do Tween 80 / Propilenoglicol 1:1



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: valor da CMC 0,016

Gráfico 4 – Concentração micelar crítica do Tween/ propilenoglicol 2:1



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: valor da CMC 0,018

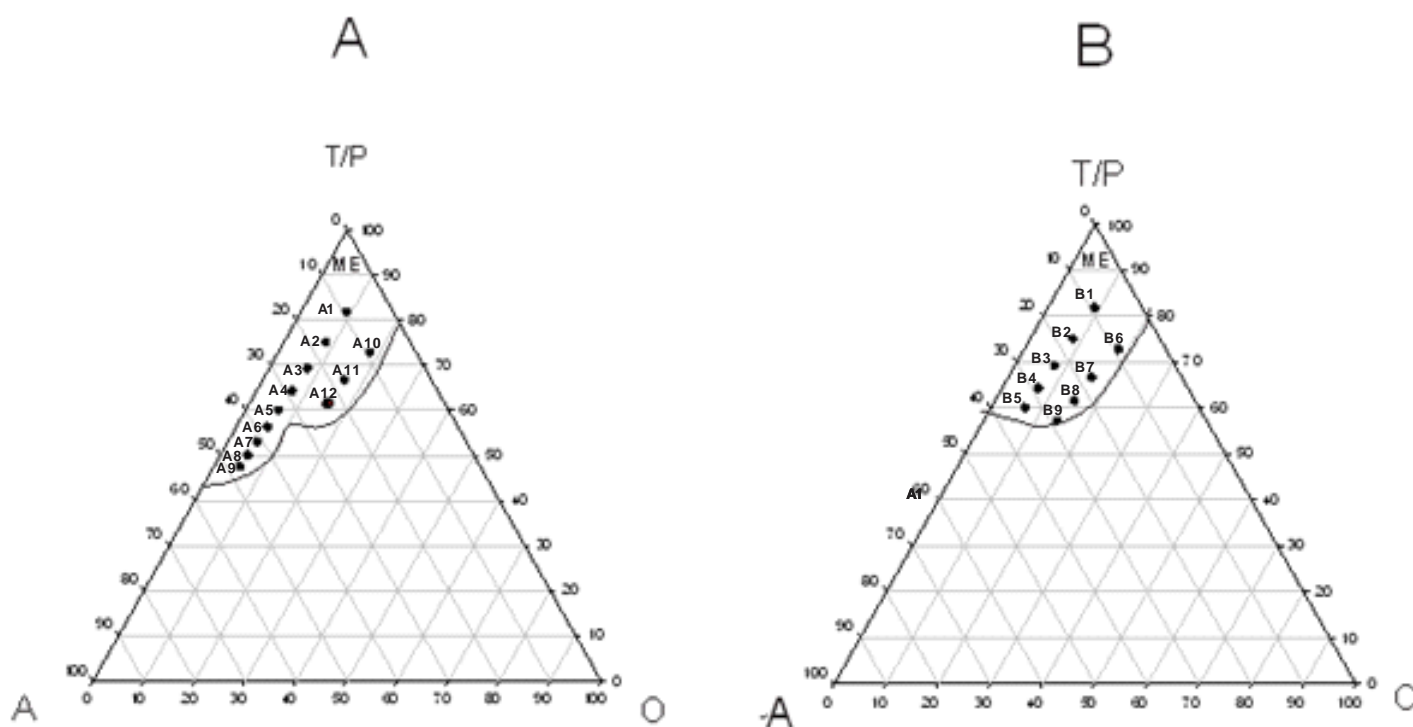
Para calcular o valor da CMC, foi encontrado o ponto de intersecção das duas retas. Observa-se então que o valor da CMC do tween 80 foi de 0,022 g/l e na presença do propilenoglicol na proporção 1:1, esse valor cai para 0,016, confirmando assim a ação do propilenoglicol como cotensoativo do sistema. Ao analisar a proporção tween/propilenoglicol 2:1, observa-se um ligeiro aumento no valor da CMC que vai para 0,018 g/l. Esse aumento é considerado aceitável, pois na proporção 2:1 a quantidade de propilenoglicol é menor, consequentemente a redução da tensão superficial é menor que em maiores proporções de propilenoglicol, justificando a característica de cotensoativo do mesmo e sua ação sinérgica.

Segundo Rosen & Kunjappu (2012), quando uma mistura de tensoativo e cotensoativo é utilizada para a formação de micelas e ocorre uma redução na CMC, pode-se dizer que houve um sinergismo e, do contrário, seria um antagonismo. Vale ressaltar que, para a realização desse experimento foram adquiridos tensoativos exclusivamente para esse teste, livre de qualquer impureza externa e dentro do prazo de validade, já que, segundo Balan (2006), a presença de impurezas pode interferir na tensão superficial.

5.4 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS ATRAVÉS DO DIAGRAMA DE FASES

O diagrama de fases pseudoternário foi utilizado para a obtenção das amostras. Com seu auxílio, é possível descrever em que condições experimentais os componentes devem ser combinados, a fim de formar as microemulsões. Estas foram desenvolvidas, utilizando os componentes água, óleo essencial de *L. gracilis*, tween 80 e propilenoglicol. Foram obtidos dois diagramas de fases, um na proporção de tween/propilenoglicol 1:1 e outro na proporção tween/propilenoglicol 2:1. Para a obtenção desses diagramas, foi utilizado o método da titulação que é bastante reproduzível. Foram observados 12 pontos do DFPT 1:1, que formaram um sistema homogêneo, límpido e translúcido, característico de microemulsão e 9 pontos no DFPT 2:1, conforme Figura 11, e a composição centesimal das amostras está representada na Tabela 4.:

Figura 11 – Diagramas de fases A e B e as microemulsões obtidas.



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: cada ponto representa uma microemulsão (ME) obtida.

T/P – Tween e Propileno / A-água / O-óleo.

Tabela 4 – Composição centesimal das amostras A1-A12 do diagrama A (Tween / Propilenoglicol 1:1) e B1-B9 do diagrama B (Tween / Propilenoglicol 2:1)

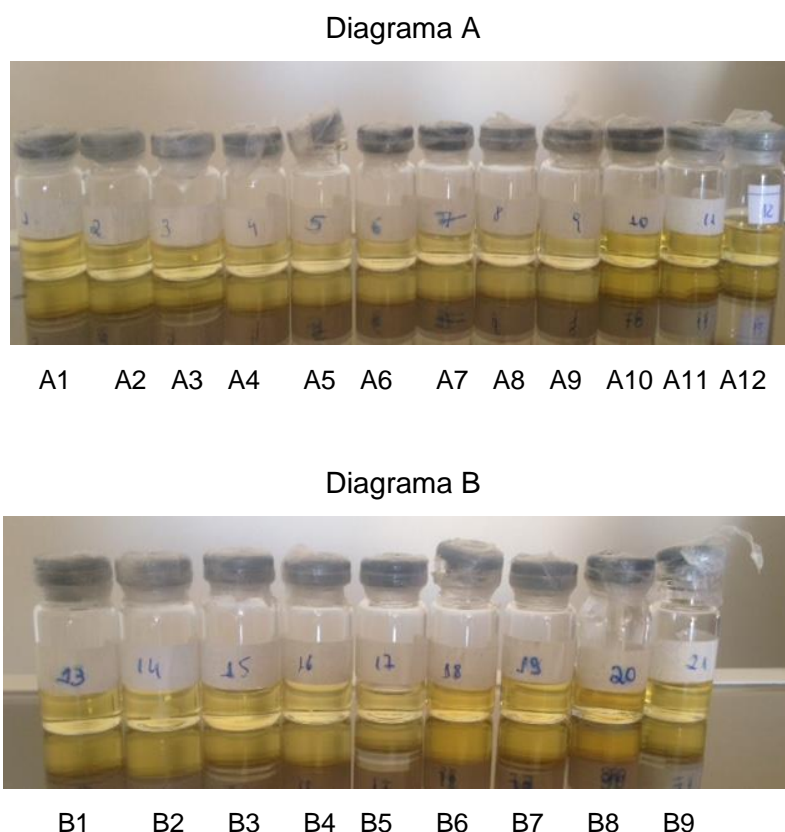
Formulação	Água (%)	Tween 80 (%)	Propilenoglicol (%)	Óleo de <i>L. gracilis</i> (%)
DIAGRAMA A				
A1	9,00	41,00	41,00	9,00
A2	16,00	38,00	38,00	8,00
A3	23,00	35,00	35,00	7,00
A4	29,00	32,00	32,00	7,00
A5	33,34	30,00	30,00	6,66
A6	38,00	28,00	28,00	6,00
A7	42,00	26,00	26,00	6,00
A8	44,00	25%	25	6,00
A9	47,00	24,00	24,00	5,00
A10	9,00	36,5	36,5	18,00
A11	17,00	33,00	33,00	17,00
A12	23,00	31,00	31,00	15,00
DIAGRAMA B				
B1	9,00	55,00	27,00	9,00
B2	17,00	50,00	25,00	8,00
B3	23,00	46,00	23,00	8,00
B4	29,00	43,00	21,00	7,00
B5	33,00	40,00	20,00	7,00
B6	9,00	49,00	24,00	18,00
B7	17,00	45,00	22,00	16,00
B8	23,00	41,00	21,00	15,00
B9	29,00	36,00	21,00	14,00

Fonte: O AUTOR (2016)

O aspecto visual dessas formulações foi bastante característico de microemulsão, apresentando um aspecto límpido e translúcido de coloração amarelada. Isso indica que as proporções utilizadas entre os componentes foram adequadas para reduzir a tensão interfacial na formação dos sistemas. Após cinco dias da preparação das amostras, as formulações mantiveram o mesmo aspecto e

permaneceram constantes durante todo o período de estudo, conforme Figura 12 abaixo:

Figura 12 – Microemulsões obtidas a partir dos diagramas de fases A e B



Fonte: O AUTOR (2016)

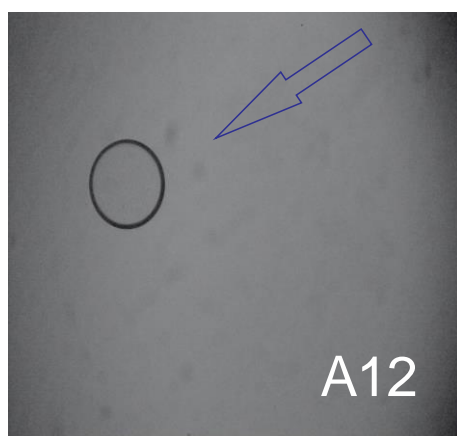
O tensoativo tween 80 e o cotensoativo propilenoglicol foram escolhidos por serem tensoativos não-iônicos, que possuem uma grande vantagem para utilização em formulações farmacêuticas, pois têm baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade e uma elevada estabilidade química (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR & MALLYA, 2011).

O valor do EHL do óleo também é uma informação bastante importante para a escolha dos tensoativos, pois segundo Schmidts & Cols (2010) apud Assis (2014), as microemulsões são melhores formuladas quando o EHL da mistura dos tensoativos está próximo ao EHL do óleo.

5.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS MICROEMULSÕES

A caracterização foi realizada com as amostras formadas nos dois diagramas (A e B) e todas apresentaram um comportamento isotrópico (campo escuro), ou seja, as amostras sob o plano da luz polarizada não desviam a luz. A amostra A12 representa as formulações obtidas nos dois diagramas e sua fotomicrografia está representada na Figura 13.

Figura 13 – Fotomicrografia do comportamento isotrópico (campo escuro) representada pela microemulsão A12 do diagrama A



Fonte: O AUTOR (2016)

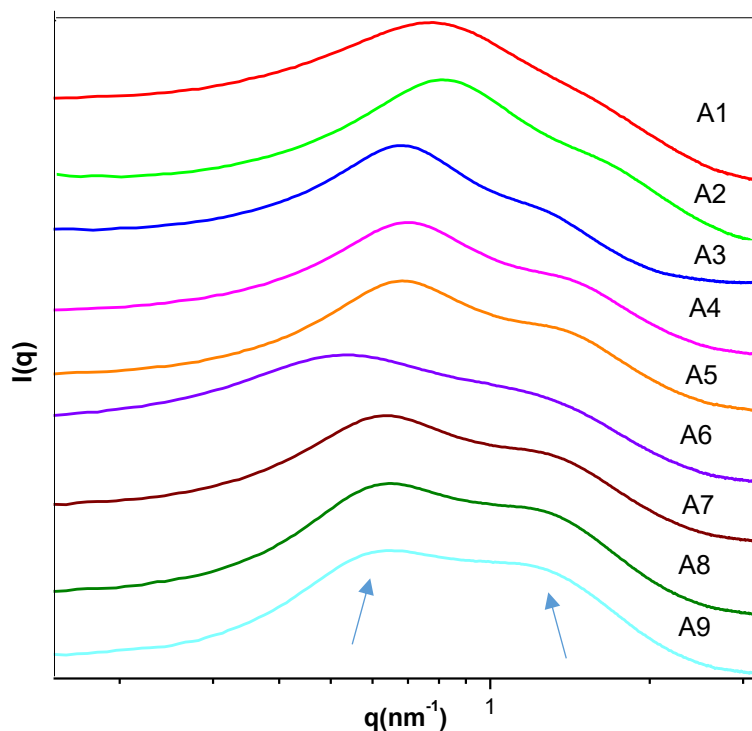
Nota: A seta indica a presença de bolha de ar para comprovar o campo escuro.

Através da técnica de SAXS, também é possível confirmar a isotropia do sistema. Os resultados do SAXS foram coerentes com a técnica de microscopia de luz polarizada, indicando formação de microemulsão e um aspecto isotrópico nos sistemas. Adiante, é apresentado o gráfico da curva da intensidade de espalhamento (I) em função do vetor de espalhamento (q) para as amostras do diagrama A da primeira linha de diluição (A1 a A9). Os sistemas exibem um pico alargado centrado em q , observando que não houve formação de cristal líquido e que a estrutura observada nas amostras analisadas é esférica, confirmando a existência de microemulsão.

O perfil das curvas de SAXS (Gráfico 5) mostra, também, que as formulações apresentam um segundo ombro, com valores de q mais altos e, de acordo com a microscopia de luz polarizada, não existe a formação de estruturas birrefringentes,

eliminando, assim, a possibilidade da formação de estruturas cristalinas. Pode-se inferir, então, que esta é uma região de microemulsões bicontínuas.

Gráfico 5 – Curvas de SAXS das amostras A1 a A9



Fonte: O AUTOR (2016)

Nota: As setas indicam formação de um pico alongado centrado seguido de um segundo ombro ou pico.

Foi observado neste trabalho que os valores da condutividade elétrica, não só desta linha de diluição analisada, mas das amostras dos dois diagramas, apresentaram valores muito baixos. Esse fato pode ser explicado pela alta quantidade de tensoativo exigida por este tipo de sistema, assim como foi encontrado por Reis (2014), em que foi obtido valor muito baixo de condutividade em uma provável microemulsão do tipo O/A, justificada pela alta quantidade de tensoativo utilizada.

Conforme a Tabela 5, a condutividade elétrica apresenta coerência com a composição dos sistemas, confirmando o aumento da fase aquosa e a diminuição dos tensoativos e da fase oleosa. A condutividade elétrica mostrou-se proporcional ao aumento da fase aquosa.

Tabela 5 – Condutividade elétrica das amostras dos DIAGRAMAS

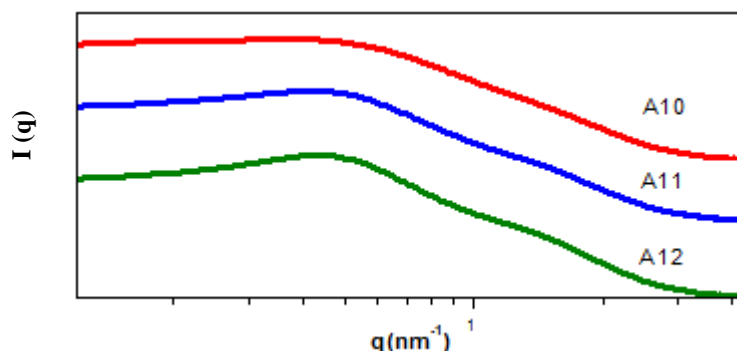
FORMULAÇÃO	ÁGUA (%)	TWEEN 80 (%)	PROPILENOG. (%)	ÓLEO DE Lipia G. (%)	CONDUTIVIDADE ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)
DIAGRAMA A					
Primeira linha de diluição					
A1	9,00	41,00	41,00	9,00	4,2
A2	16,00	38,00	38,00	8,00	6,2
A3	23,00	35,00	35,00	7,00	9,6
A4	29,00	32,00	32,00	7,00	16,3
A5	33,00	30,00	30,00	7,00	20,6
A6	38,00	28,00	28,00	6,00	27,7
A7	42,00	26,00	26,00	6,00	33,8
A8	44,00	25,00	25,00	6,00	35,3
A9	47,00	24,00	24,00	5,00	42,6
Segunda linha de diluição					
A10	9,00	36,5	36,50	18,00	3,5
A11	17,00	33,00	33,00	17,00	8,0
A12	23,00	31,00	31,00	15,00	12,1
DIAGRAMA B					
Primeira linha de diluição					
B1	9,00	55,00	55,00	9,00	4,9
B2	17,00	50,00	50,00	8,00	10,5
B3	23,00	46,00	46,00	8,00	12,5
B4	29,00	43,00	43,00	7,00	23,3
B5	33,00	40,00	40,00	7,00	23,6
Segunda linha de diluição					
B6	9,00%	49,00%	24,00%	18,00%	5,2
B7	17,00	45,00	22,00	16,00	8,7
B8	23,00	41,00	21,00	15,00	17,1
B9	29,00	36,00	21,00	14,00	25,0

Fonte: O AUTOR (2016)

Na segunda linha de diluição (A10-A12), os gráficos do SAXS (Gráfico 6) apresentam um pico suave e pouco definido, e logo depois aparece um ombro bem característico de microemulsão bicontínua, semelhante com os gráficos de SAXS das demais formulações. Ferreira (2011) também obteve curvas de SAXS muito próximas a estas em suas microemulsões bicontínuas, desenvolvidas com baixas

quantidades de água. Esse comportamento pode estar relacionado ao tamanho da gotícula, pois o SAXS é uma técnica que consegue visualizar o espalhamento de luz de partículas de 1 a 100nm e gotículas com tamanhos maiores pode desatinar as curvas de SAXS.

Gráfico 6 – Curvas de SAXS das amostras A10 a A12



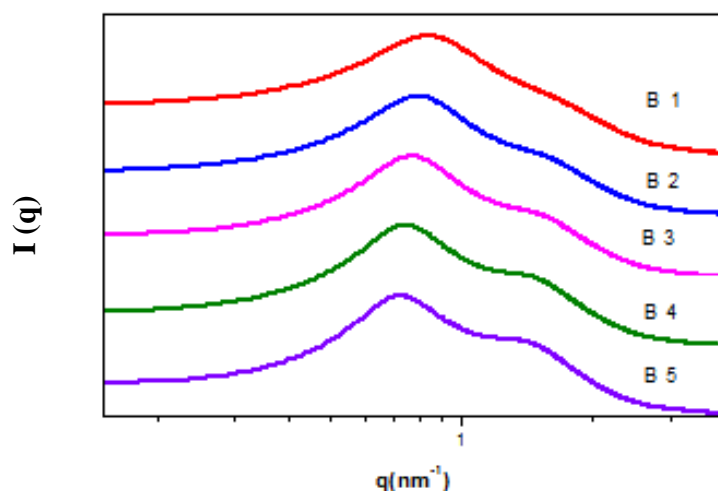
Fonte: O AUTOR (2016)

Para verificar essa hipótese, foi selecionada a formulação A12 e foram determinados o seu tamanho e o índice de polidispersão através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), uma técnica precisa e adequada para os estudos das propriedades internas das microemulsões. Essa formulação apresentou um índice de polidispersão de 0,267, indicando uma distribuição homogênea das gotículas e um tamanho de gotícula de 140,86nm, conforme o DLS, elucidando, assim, o possível comportamento irregular nos gráficos de SAXS para esta linha de diluição.

A formulação A1 também foi selecionada para verificar seu tamanho no DLS, já que pertence a uma outra linha de diluição e não houveram discrepâncias em seus dados de SAXS. A amostra apresentou tamanho de 51,51nm, compatível com o limite de leitura do SAXS.

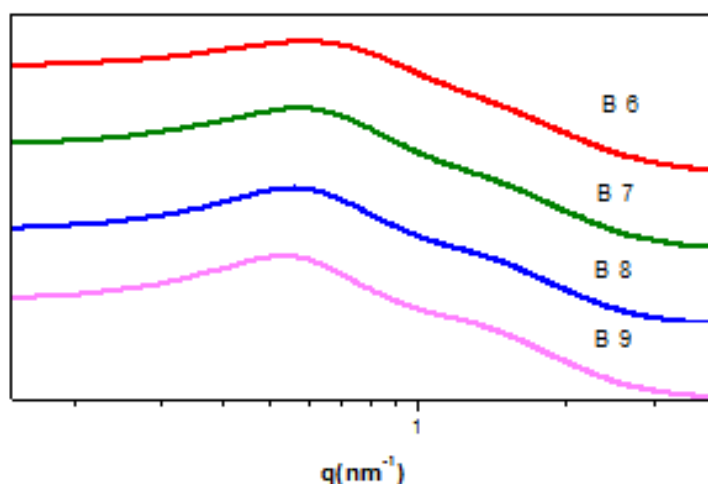
No diagrama B, para as duas linhas de diluição, também pode ser observado, através dos dados de SAXS, um comportamento típico de microemulsão bicontínuas. A formação de picos alargados, simétricos, com formação de um ombro com valores de q mais altos indicam a formação de estruturas bicontínuas (Gráfico 7 e 8).

Gráfico 7 – Curvas de SAXS das amostras B1 a B5



Fonte: O AUTOR (2016)

Gráfico 8 – Curvas de SAXS das amostras B6 a B9



Fonte: O AUTOR (2016)

Outro fator a ser observado é que o aumento na quantidade de tensoativo promove um pequeno deslocamento dos picos para valores maiores de q . Isso indica que, segundo a equação $d=2\pi/q$ (sendo d o diâmetro das partículas espalhadoras), o tamanho das gotículas do sistema diminui à medida que o valor de q aumenta, conforme demonstrado na Tabela 6. Segundo Oliveira *et al* (2004), quando aumenta o número de moléculas de tensoativo em um sistema, essas começam a se comprimir, umas ao lado das outras, promovendo uma pressão

bilateral que acaba provocando uma diminuição da tensão interfacial formando, assim, gotículas menores.

Tabela 6 – Relação quantidade de tensoativo x distância das gotículas

Formulação	Quantidade de Tensoativo (%)	Valores de Q	Distância (d) Å
Primeira linha de diluição			
B1	82	0,83	7,56
B2	75	0,79	7,94
B3	69	0,75	8,37
B4	64	0,75	8,37
B5	60	0,72	8,72
Segunda linha de diluição			
B5	73	0,61	10,29
B6	67	0,56	11,21
B7	62	0,56	11,21
B8	57	0,53	11,84

Fonte: O AUTOR (2016)

Na reologia, todas as amostras (A1-A9, A10-A12, B1-B5 e B6-B9) exibiram comportamento newtoniano (Gráfico 9), no qual apresentaram uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, apresentando valores do coeficiente de correlação $R^2 > 0,99$ indicando que existe uma boa correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (KLEIN, 2007). Os reogramas apresentados no gráfico 9 representam essa relação entre tensão e taxa de cisalhamento para todas as amostras citadas acima.

Foi possível observar que nas formulações A1-A9 e B1-B5 houve um aumento de viscosidade à medida que a fase aquosa foi sendo acrescentada e a fase oleosa diminuída. A viscosidade aumentou de 0,09 a 0,23 Pa.s nas amostras A1-A9 e de 0,24 a 0,44 Pa.s nas amostras B1 a B5. Isso pode estar relacionado ao tamanho de gota que segundo Moghimipour, Salimi & Eftekhari (2013) é pertinente à quantidade de óleo no sistema que quanto maior essa quantidade maior o tamanho de gotícula e vice-versa.

Diante disto observa-se então que as amostras com menor quantidade de óleo (A9) possuíam um menor tamanho de gotícula e uma maior viscosidade e as com maior quantidade de óleo (A1) possuíam maiores tamanhos de gotículas e viscosidades menores, conforme Tabela 7. A mesma inferência foi obtida por Salager (1999) e Oliveira (2010), os quais concluíram que gotas menores implicam em viscosidades maiores.

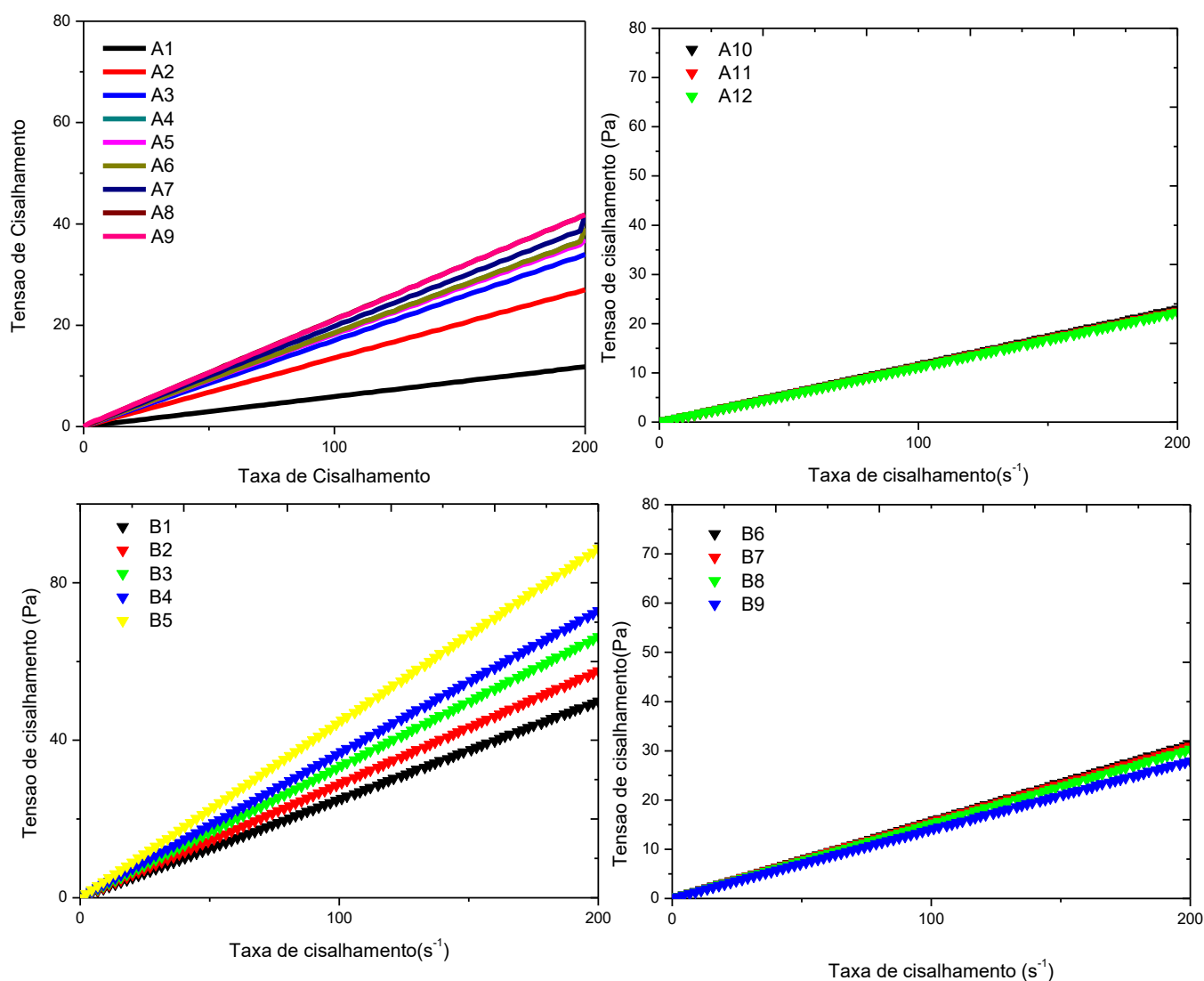
Tabela 7 – Relação viscosidade em função do tamanho da gotícula e quantidade de óleo

Formulação	Quantidade de óleo (%)	Tamanho de Gotícula (nm)	Viscosidade (Pa. s)
A1	9	51,51	0,09
A9	5	13	0,23

Fonte: O AUTOR (2016)

Nas formulações da linha de diluição A10-A12 e B6-B9, não houve alteração significativa no comportamento reológico do sistema, tendo suas curvas praticamente sobrepostas.

Gráfico 9 – Reograma das formulações obtidas (A1-A9, A10-A12, B1-B5, B6-B9).



Fonte: O AUTOR (2016)

5.6 ESCOLHA DA FORMULAÇÃO PARA A ATIVIDADE AMEBICIDA

Dos dois diagramas formados, o diagrama A foi o escolhido para a seleção da amostra utilizada nos ensaios biológicos, pelo fato de ter formado um maior número de sistemas termodinamicamente estáveis devido à eficiente proporção de tensoativo e cotensoativo (1:1) utilizada, comprovada através do teste de tensão superficial.

Dentre as amostras do diagrama A, três formulações foram consideradas como pretendentes para os ensaios, A10, A11 e A12, pelo fato de possuírem maiores quantidades de óleo.

De acordo com os dados de SAXS e de outras técnicas de caracterização, as amostras foram consideradas bicontínuas. Assim, o tipo de microemulsão não influenciaria muito na escolha da formulação. Diante disto, pretendeu-se escolher aquela formulação que possuísse uma boa quantidade de óleo essencial (constituente necessário para exercer a atividade), mas que, na medida do possível, obtivesse uma menor quantidade de tensoativo, já que não se tinham conhecimentos prévios sobre uma possível atividade amebicida dos mesmos e nem que tipo de influência os tensoativos poderiam causar nos testes. Assim, a formulação A12 foi selecionada para os ensaios de atividade amebicida.

Com o intuito de observar se uma formulação com tamanho de gota menor apresentava melhores resultados, resolveu-se realizar os testes amebicidas com a formulação A9, apesar de não apresentar grandes quantidades de óleo, por possuir um tamanho de gota de 13nm.

5.7 CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE CULTURA DE MAMÍFEROS

No teste de citotoxicidade das amostras sobre células de cultura de mamíferos (Tabela 8), o óleo essencial de *L. gracilis*, para as concentrações de 10 e 20 µg/ml foi considerado não citotóxico (100% e 94,3% de viabilidade). Já na concentração de 50 µg/ml apresentou leve citotoxicidade (67% de viabilidade) e quando utilizado na concentração de 100 e 150 µg/ml o óleo apresentou severa toxicidade. Enquanto que a mistura tween/propilenoglicol 1:1 e a formulação foram consideradas não citotóxicas em todas as concentrações utilizadas (10, 20, 50, 100, 150 µg/ml) com viabilidade > 80%.

*Tabela 8 – Atividade citotóxica do óleo essencial de *L. gracilis*, do tween 80/Propilenoglicol 1:1 e da formulação sobre fibroblastos*

Concentração (µg/ml)	Viabilidade (%)		
	Óleo Essencial de <i>L. gracilis</i>	Tween + Propilenoglicol 1:1	Formulação
10	100,0±0,234	100,0±0,352	87,1±0,166
20	94,3±0,414	100,0±0,133	92,0±0,156
50	67,0±0,351*	95,9±0,187	95,2±0,132
100	23,0±0,13***	100,0±0,199	84,4±0,24
150	0,0±0,051***	100,0±0,187	82,8±0,197

Nota: não citotóxicos = viabilidade > 80%;

*leve citotoxicidade = viabilidade > 50% e < 80%;

**moderada citotoxicidade = viabilidade > 30% e < 50%;

***severa citotoxicidade = viabilidade < 30%

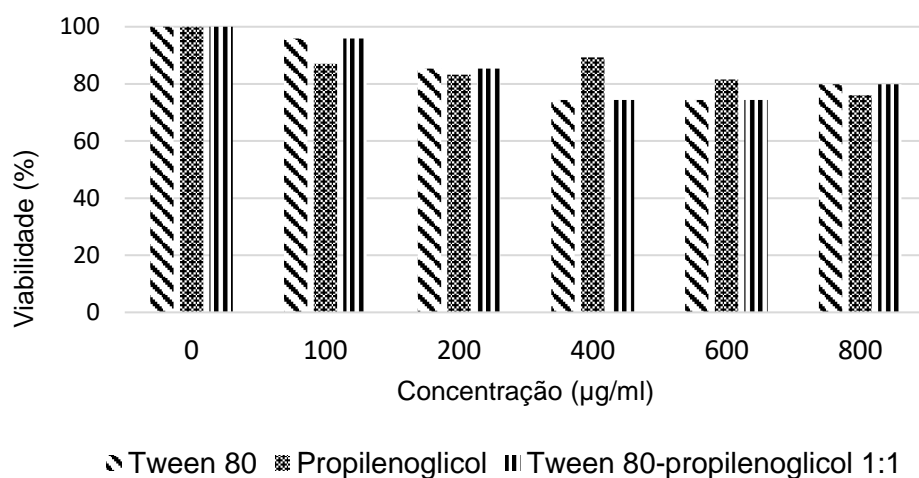
5.8 ATIVIDADE AMEBICIDA

Antes de realizar a atividade amebicida da microemulsão contendo o óleo essencial de *L. gracilis*, foi necessário avaliar os excipientes da formulação e verificar se existia possibilidade de os mesmos possuírem atividade frente aos trofozoítos das *Acanthamoebas*. Diante do exposto acima, foi realizado os seguintes experimentos:

5.8.1 Atividade amebicida dos excipientes da formulação

Conforme Gráfico 10, os trofozoítos foram expostos aos tensoativos nas concentrações de 100, 200, 400, 600 e 800 µg/ml e na concentração mais elevada inativou pouco mais de 20%. Os resultados do teste ANOVA evidenciaram que, para o tween e o propilenoglicol, não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhuma das médias das concentrações utilizadas com $p = 0,210$ e $0,069$ respectivamente.

Gráfico 10 – Atividade amebicida do tween 80, propilenoglicol e da mistura tween 80 / propilenoglicol 1:1.



Fonte: O AUTOR (2016)

Além dos testes com os componentes isolados, foi realizado o experimento com a mistura de propilenoglicol e tween 80 na proporção 1:1, mesma proporção utilizada na formulação, a fim de descartar qualquer possibilidade de interação entre eles que pudesse manifestar alguma ação amebicida.

No teste de ANOVA, os resultados mostraram que houve diferença significativa nas médias das concentrações ($p < 0,001$). Para verificar entre quais médias houve diferença significativa, foi realizado o teste de BONFERRONI e foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de 600 ($p < 0,01$) e 800µg/ml ($p < 0,05$) em relação ao controle. Já nas concentrações de 100 a 400µg/ml, não houve diferenças em relação ao controle.

Ressalta-se que essas concentrações utilizadas para os testes com os excipientes (100 a 800 µg/ml) estão muito acima da concentração presente na formulação estudada. Observou-se que o máximo da concentração de cada tensoativo presente na formulação e que foram testadas nas amebas não chega a 5µg/ml. O que se nota, segundo o Gráfico 10, é que nessa concentração não ocorre praticamente inativação das amebas comparadas ao controle que é composto apenas de meio PYG e amebas.

Só após a realização dessas análises foi possível dar seguimento aos experimentos com o óleo essencial de *L. gracilis* e, posteriormente, com as microemulsões desenvolvidas.

5.8.2 Atividade amebicida do óleo essencial de *L. gracilis*

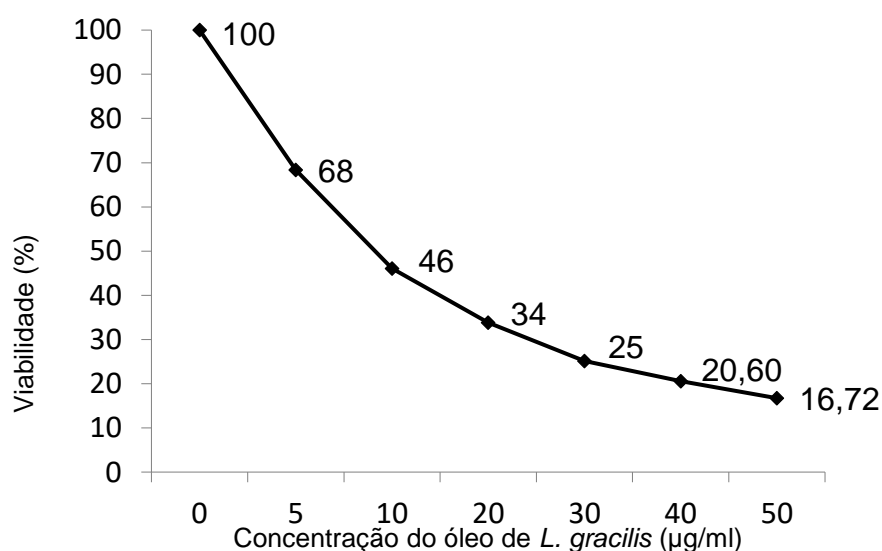
Com base no trabalho de Santos *et al* (2016) e, de acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de *L. gracilis* foi testado nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml (

Gráfico 11). Logo na primeira concentração, de 5 µg/ml, foi observado a inviabilidade de 32% das amebas. Já na concentração máxima, 50 µg/ml, foi inibido o crescimento de 83% das amebas.

Foi aplicado o teste de ANOVA e se verificou que houve diferença significativa entre as médias das concentrações ($p < 0,001$). Posteriormente, foi aplicado o teste de BONFERRONI e seu resultado indicou que houve diferenças significativas entre todas as concentrações de óleo essencial de *L. gracilis* utilizado em relação ao controle ($p < 0,001$).

A IC50 (Concentração Inibitória Máxima) foi encontrada próxima ao valor de 9,52 µg/ml, resultado semelhante aos estudos de Santos *et al* (2016), que avaliaram a atividade amebicida do óleo essencial de *L. gracilis* em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*, provenientes de cepa ambiental e encontraram o valor de 10,08 µg/ml para a IC50.

Gráfico 11 – Atividade amebicida do óleo *L. gracilis*



Fonte: O AUTOR (2016)

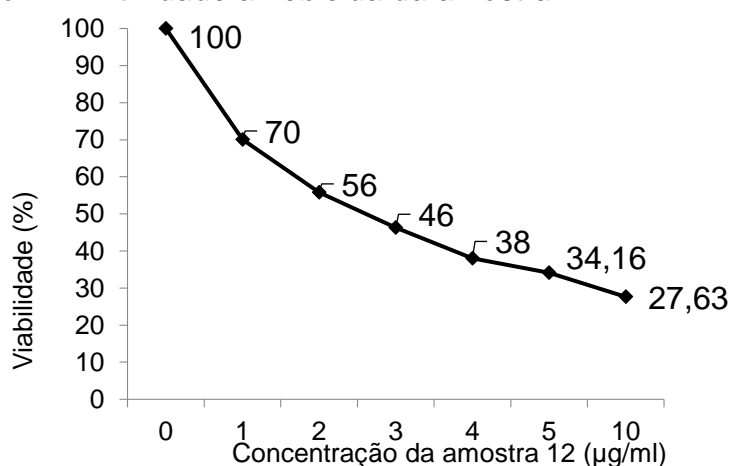
5.8.3 Atividade amebicida das microemulsões contendo óleo essencial de *L. gracilis*

A microemulsão desenvolvida (A12) foi testada nas concentrações semelhantes às realizadas com o óleo de *L. gracilis*, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml. Foi observado que, logo na concentração de 5 µg/ml, a microemulsão inativou mais de 60% das amebas, indicando que a IC₅₀ estaria abaixo dessas concentrações. Outra sequência de testes foi realizada em concentrações mais baixas: 1, 2, 3, 4, 5 e 10 µg/ml.

De acordo com o Gráfico 12, a formulação apresentou atividade amebicida em todas as concentrações no período de tempo de 24 horas. Já nas menores concentrações, de 1 e 2 µg/ml, a formulação inviabilizou 30 e 44%, respectivamente, dos trofozoítos. Esse resultado diverge significativamente do controle que recebeu apenas meio de cultura PYG e amebas. Nas concentrações maiores, 3, 4, 5 e 10 µg/ml, a inviabilidade foi de 54, 62, 66 e 72%, respectivamente, comparados com o controle.

O teste ANOVA indica que houve diferença significativa entre as médias das concentrações utilizadas ($p < 0,001$). Para descobrir onde houve diferenças, foi utilizado o teste de BONFERRONI, que mostrou diferença significativa entre as médias de todas as concentrações em relação ao controle ($p < 0,001$). Observa-se, também, que a atividade amebicida da microemulsão foi dose dependente, significando que a inativação dos trofozoítos foi diretamente proporcional ao aumento da dose.

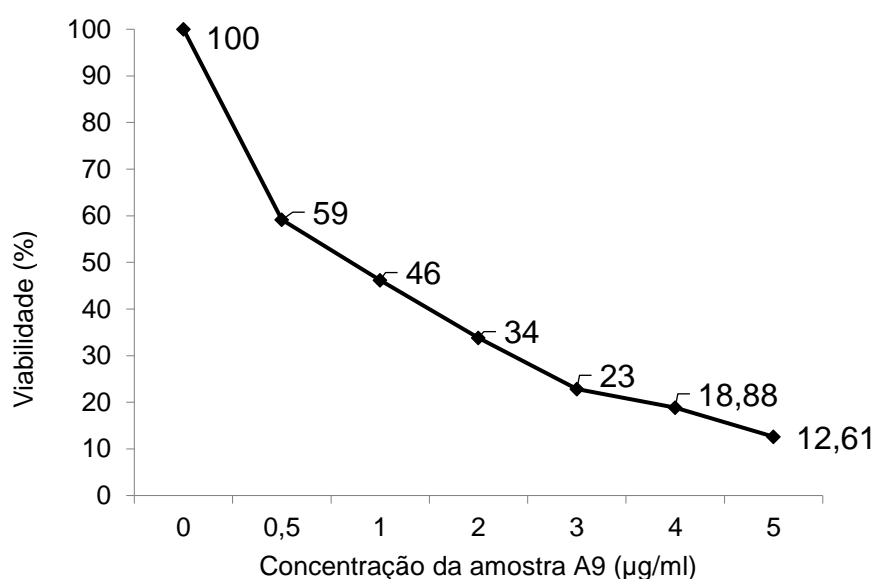
Gráfico 12 – Atividade amebicida da amostra 12



Fonte: O AUTOR (2016)

Em relação à IC50 obtida pelo óleo de *L. gracilis* puro, a formulação A12 conseguiu diminuí-la para 2,55 µg/ml, ou seja, quando incorporado na formulação, é necessária uma dose de óleo essencial de *L. gracilis* de, aproximadamente, três vezes menos para inativar a mesma quantidade de trofozoítos (50%). Ao utilizar a formulação A9 (Gráfico 13), que possui um tamanho de gotícula de 13nm, essa IC50 caiu para 0,65 µg/ml, tornando esta microemulsão 15 vezes mais potente em relação ao óleo de *L. gracilis* puro.

Gráfico 13 – Atividade Amebicida da Amostra 9



Fonte: O AUTOR (2016)

No teste de ANOVA para a formulação A9, os resultados revelaram que houve diferença significativa nas médias das concentrações ($p < 0,001$). No teste de BONFERRONI, foram encontradas diferenças significativas entre as médias de todas as concentrações em relação ao controle ($p < 0,001$).

Comparado a outros estudos, a microemulsão com o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou excelente atividade. CASTRO *et al* (2013) utilizaram o extrato de *Acanthospermum australe* (carrapicho rasteiro) frente a trofozoítos de *A. polyphaga* e obteve uma IC50 de 8,77mg/ml. Um outro fator observado no trabalho de CASTRO *et al* (2013) e que não foi observado no presente trabalho foi a formação de cistos em todas as concentrações de extrato utilizado. Isso é muito importante porque o principal fator causador de resistência aos tratamentos é a capacidade de

encistamento das amebas que conduz a uma reinfecção (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

No trabalho realizado por Ródio (2008), no qual avaliou a atividade amebicida do extrato aquoso bruto de *Pterocaulon playstachyum*, conhecida como quitoco, sobre os trofozoítos de *A. castellanii*, foi possível observar que 41,4% dos trofozoítos foram inativados utilizando uma dose de 5 mg/ml do extrato em um tempo de 48 horas. Enquanto que, neste estudo, para inativar esta mesma concentração de trofozoítos, foi necessária uma dose de, aproximadamente, 3 µg/ml com a formulação A12 e menos de 1µg/ml com a formulação A9, em apenas 24 horas.

Em um outro estudo realizado por Karusky (2014), no qual se avaliou a atividade amebicida do extrato aquoso bruto de própolis verde, foi necessária uma dose de 2,5 mg/ml do extrato para inativar 58% dos trofozoítos em 24 horas, enquanto que a formulação A9, do presente trabalho, conseguiu inativar esses 58% com uma dose de 0,5 µg/ml, também em 24 horas.

Em relação à otimização dos resultados obtidos entre as formulações A12 e A9, esta pode ser justificada pelo tamanho de gotícula da microemulsão, que na formulação A12 foi de 140 nm e na A9 foi de 13nm. Segundo Gogotsi (2006) e Cao & Wang (2004), sistemas compostos por nanopartículas, por possuírem tamanhos menores, são mais reativos que sistemas com tamanhos de partículas maiores. Ao reduzir o tamanho de gotícula de uma microemulsão, ocorre um aumento na sua área de superfície por unidade de massa comparada a partículas maiores, tornando-as mais interativas ao meio em que está imersa.

6 CONCLUSÃO

- O teste da tensão superficial demonstrou que o propilenoglicol possui influência sinérgica sobre o tween 80, agindo como cotensoativo.
- Conseguiu-se obter sistemas microemulsionados contendo o óleo essencial de *L. gracilis*, utilizando o Tween 80 e o propilenoglicol como tensoativos e cotensoativos, respectivamente, empregando-se a ferramenta do diagrama de fases, que se mostrou simples e útil para a reprodução desses sistemas.
- Através da técnica de SAXS, foi possível observar que as microemulsões estão em uma região bicontínua e que os valores de q estão relacionados com a quantidade de tensoativo do sistema e, conseqüentemente, ao tamanho das gotículas.
- Por meio do DLS, foi confirmado que o sistema é formado por gotículas dispersas na ordem de nanômetros e com um índice de polidispersão baixo, característico de uma microemulsão.
- Na análise reológica, percebeu-se que os sistemas possuem comportamento newtoniano típico de microemulsão e sua viscosidade cresce à medida que a fase aquosa aumenta e a fase oleosa diminui.
- Nos testes biológicos, os tensoativos não apresentaram atividade amebicida significativa frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.
- O teste da citotoxicidade mostrou que o óleo essencial de *L.gracilis* em suas maiores concentrações (100 e 150 μ g/ml) é considerado tóxico, enquanto que a formulação e os tensoativos não são tóxicos em todas as concentrações utilizadas.

- A formulação A12 apresentou uma excelente atividade amebicida, três vezes mais potente que o óleo essencial de *L. gracilis* puro, enquanto que a formulação A9, por possuir tamanho de gota menor, apresentou-se 15 vezes mais potente que o óleo essencial puro, com uma IC50 de 0,65 µl/ml.

REFERÊNCIAS

- ABEDKHOJASTEH, H.; NIYYATI, M.; REZAEI, S.; MOHEBALI, M.; FARNIA, S.; KAZEMI-RAD, E.; ROOZAFZON, R.; SIANATI, H.; REZAEIAN, M.; HEIDARI, M. Identifying differentially expressed genes in trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* T4 genotype: Implications for developing new treatments for *Acanthamoeba* keratitis. **European Journal of Protistology**, v. 51, n. 1, p. 34-41, Feb. 2015.
- ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. **Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc.** 2005. Disponível em: <<http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>>. Acesso em 14 de abril de 2015.
- ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Elsevier, v. 17, n. 5, p. 274-280, Oct. 2012.
- ALBUQUERQUE, C. C. de; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. de L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *L. gracilis* schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 527-535, Jul. 2006.
- AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **Hybrid organic inorganic composites**, Washington DC, 1995.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, Jun. 2006.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JÚNIOR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 6. ed. São Paulo: Premier, 568p. 2000.
- ANTONIO, M. E. C. O. de. **Permeação Cutânea in Vitro como Ferramenta Auxiliar para o Estudo de Formulações Semi-Sólidas de Cetoconazol para Aplicações Tópicas**. 2007. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 307-311, Jul. / Sep. 2006.

ASSIS, G.B. de. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo óleo essencial de alecrim- *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae).** 2014. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

ASTORGA, B.; LORENZO-MORALES, J.; NAVARRO, C. M. M.; ALARCÓN, V.; MORENO, J.; GONZÁLEZ, A. C.; NAVARRETE, E.; PIÑERO, J. E.; VALLADARES, B. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Wiley, v. 58, n. 6, p. 542-544, Nov. / Dec. 2011.

ATTI-SERAFINI, L. A; PANSERA, M. R.; ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M; PAULETTI, G. F; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v. 4, n. 2, p. 72–74, 2002.

BAIG, A. M. Pathogenesis of amoebic encephalitis: are the amoebae being credited to an ‘inside job’ done by the host immune response? **Acta Tropica**, 148, p. 72-76, Aug. 2015.

BALAN, J. C. **Estudo da interação de derivados aquo-solúveis de celulose com tensoativos catiônicos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 2006.

BARBOSA, V. S. L.; PAIVA, A. B. de; FÉLIX, A. K. A.; RODRIGUES, S. S. F. B.; MELO, E. de A. de. Atividade antioxidante e avaliação do tempo de extração no rendimento do óleo essencial de *Lippia Gracilis* Schau. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA (CONNEPI), 5., 2010, Maceió. **Anais...** Maceió: IFAL, 2010.

BARROS, A. R. A. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica de microemulsões O/A contendo anfotericina B.** 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

BARROS, J. de N.; MASCARO, V. L. D.; LOWEN, M.; MARTINS, M. C.; FORONDA, A. Citologia de impressão no diagnóstico de infecção corneana por *Acanthamoeba*: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 343-346, 2007.

BEDIN, A. C. **Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol:** desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro*. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Toledo, 2011.

BONILLA-LEMUS, P; CABALLERO VILLEGAS, A. S.; CARMONA JIMÉNEZ, J; LUGO VÁZQUEZ, A. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 145, p. S28–33, Jul. 2014. Suplemento.

BORBA, V. F. da C.; SANTANA, D. P. D. de. Caracterização e Uso de Diagramas Ternários como Ferramenta de obtenção de Sistemas Tópicos Microemulsionados. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 15., 2007, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: UFPE, 2007. Disponível em <[http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2007/CONIC_JOIC_2007%20\(E\)/conic/pibic/40/40325.pdf](http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2007/CONIC_JOIC_2007%20(E)/conic/pibic/40/40325.pdf)>. Acesso em 20 jun. 2007.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] extraído por arraste de vapor d'água, em escala commercial. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 129-136, jan. / mar. 2008.

BRAUN, A. C. ILKO, D.; MERGET, B.; GIESELER, H.; GERMERSHAUS, O.; HOLZGRABE, U.; MEINEL, L. Predicting critical micelle concentration and micelle molecular weight of polysorbate 80 using compendial methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Elsevier, v. 94, p. 559-568, Aug. 2015.

CAO, G.; WANG, Y. **Nanostructures and Nanomaterials: synthesis, properties and applications**. In: World Scientific Series in Nanoscience and Nanotechnology. 2 ed. Imperial College Press: London, 2004, p. 36-42.

CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 03, p.470-477, Feb. 2009.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas Nanoestruturados para Potencial Administração Nasal de Zidovudina**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

CASTRILLÓN, J. C.; OROZCO; L. P. *Acanthamoeba spp.* como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 30, n. 2, p. 147-155, Abr. 2013.

CASTRO, L. C.; SAUTER, I. P.; ETHUR, E. M.; KAUFFMANN, C.; DALL'AGNOL, R.; SOUZA, J.; CIBULSKI, S. P.; MUNIZAW; WEIDLICH, L.; LOHMANN, P. M.; ROEHE, P. M.; GERMANI, J. C.; ROTT, M. B.; VAND DER SAND, S. T. *In vitro* effect of *Acanthospermum australe* (Asteraceae) extracts on *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 589-594, 2013.

CAUMO, K. S.; MONTEIRO, K. M.; OTT, T. R.; MASCHIO, V. J.; WAGNER, G.; FERREIRA, H. B.; ROTT, M. B. Proteomic profiling of the infective trphozoite stage of *acanthamoeba polyphaga*. **Acta Tropica**, v. 140, p. 166-172, Dec. 2014.

CHAUD, N.G.A.; FRANÇA, E. L.; RIBEIRO, E. B.; PESSOA, R.; LANES, P. K. D.; FRANÇA, A. C. H. Desenvolvimento e Caracterização de um Neomaterial a base de microemulsão como veículo de *Lippia Sidoides*. **Revista Sodebras**, v. 9, n. 98, p. 31-38, Fev. 2014.

CORSARO, D.; PAGES, G. S.; CATALAN, V.; LORET, J. F.; GREUB, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Elsevier, v. 213, n. 3, p. 158–166, Jun. 2010.

COSTA, A. M. B. **Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck pelo método de coacervação simples para o controle larvicida do *Aedes aegypti***. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE. 2010

CRUZ, E. M. de O.; PINTO, J. A. O.; FONTES, S. S.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BACCI, L.; JESUS, H. C. R. de; SANTOS, D. de A.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *L. gracilis* Schauer Germplasm. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal, v. 2014, id 314626 p. 1-9., 2014.

CUNHA JÚNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; OREFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. São Paulo, v. 66, n. 3, p. 385-391, maio/jun. 2003.

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**, Araraquara, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, Oct. 2007.

DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; RODRIGUES, K. A. da F.; BRITO, M. C. A.; ROSA, C. dos S.; AMARAL, F. M. M. do; MONTEIRO, O. dos S.; ANDRADE, E. H. de A.; MAIA, J. G. S.; MORAES, D. F. C. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, Mar. 2015.

EI-MAGHRABY, G. M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, Elsevier, v. 355, n. 1-2, p. 285-292, May 2008.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2006. 345f. Tese (Livre Docência em Farmacotécnica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

FENG-FENG, L.; LI-QIANG, Z.; CHEN-HO, T. Phase behavior of the microemulsions and the stability of chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1-2 p. 237-46-Sep. 2005.

FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **REM: Revista Escola de Minas**. Ouro Preto, v. 58, n. 1 p. 83-87, jan. / mar. 2005.

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

FERREIRA, M. **Caracterização Estrutural de Sistemas formados por compostos Siliconados**: mesofases, microemulsões e nanoemulsões. 2011. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

FERREIRA, S. G. **Sistemas nanoestruturados obtidos a partir de óleo essencial de *Citrus sinensis*/água estabilizados por tensoativos**: avaliação estrutural e potencial uso no controle larvídico do *Aedes Aegypti*. 2014. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

FERREIRA, S.G.; CONCEIÇÃO, V.S.; GOUVEIA, N.S.; SANTOS, G.S.; SANTOS, R.L.; LIRA, A.A.; CAVALCANTI, S.C.; SARMENTO, V.H.; NUNES, R.S. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, 190-196. Oct. 2015.

FONTES, S. F.; HERNANDES, R.; MACARI, M.; BERNAL, F. M. Viscosidade do Sangue como Parâmetro de Diagnóstico da Síndrome Ascítica em Linhagens de Frangos de Corte com Diferentes Suscetibilidade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 45-51, jan. / abr. 2000

FORISTER, J. F. Y.; FORISTER, E. F.; YEUNG, K. K.; CHUNG, M. Y.; TSUI, A.; WEISSMAN, B. A. Prevalence of contact lens-related complications: UCLA Contact Lens Study. **Eye & Contact Lens**, Seattle, v. 35, n. 4, p. 176-180, Jul. 2009.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A. da; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. de. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo**, v. 41, n. 03, p. 301-313, jul. / set. 2005.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; SANTILLI, C. V.; TABOSA DO EGITO, E. S.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FRANZINI, C. M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral**. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

GALGANO, P. D. **Líquidos Iônicos Tensoativos: Correlação entre Estrutura Molecular e Propriedades Micelares de Cloretos de 1,3-dialquilimidazólio**. 2012. 225f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GALVÃO, J. G. **Desenvolvimento de formulação cosmética contendo carreadores lipídicos nanoestruturados à base de manteiga de *Ouratea* sp.: uma estratégia nanotecnológica para o aumento da hidratação cutânea**. 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

GILLILAN, J. **Improvement of U.S. EPA minimum risk essential oils' pesticide activity through surfactante enhancement and synergy**. 2012. 178f. Tese (Doutorado em Horticultura e Fitotecnia) – The Ohio State University, Columbus, Ohio, 2012.

GOGOTSI, Y. (Ed.). **Nanomaterials handbook**. In: Advanced Materials and Technologies Series. 1ª ed. CRC Press: Boca Raton, 2006.

GOMES, D. A. de A. **Aplicação de Microemulsões na Solubilização de Frações Pesadas de Petróleo**. 2009. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GOMES, F. do E. S. **Obtenção de Sistemas Microemulsionados e Estudo de Simulação por dinâmica Molecular de Sistemas Micelares objetivando a veiculação de produtos bioativos**. 2010. 172f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. I.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *L. gracilis* Schauer. **Eclética Química**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GONZAGA, L. **Alecrim da chapada - *L. gracilis***. 2008. 1 Fotografia. Disponível em <https://picasaweb.google.com/lh/photo/OVj3vUpScJ0rxsbUolbHA>. Acesso em 20 jun. 2015.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use – A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education**, v. 45, n. 1, p. 100-107 Jan. / Mar. 2011.

GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, Belfast, v. 3, n. 2, p. 137-142, Jun. 2009.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J. R. P.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C. H.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *L. gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 135, n. 2, p. 406-413, May 2011.

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

HARWOOD ACADEMIC. **Submicron emulsion in drug targeting and delivery**. CRC Press: Amsterdam, 1998

HENN, A. R. The surface tension of water calculated from a random network model. **Biophysical Chemistry**, v. 105, n. 2-3, p. 533-543, Sep. 2003.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 3 ed. 1997.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. **Nature**, v. 152, p. 102-105, Jul. 1943.

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

JIANG, C.; SUN, X.; WANG, Z.; ZHANG, Y. Acanthamoeba keratitis: clinical characteristics and management. **Ocular Surface**, v. 13, n. 2, p. 164-168, Apr. 2015.

JONSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. John Wiley & Sons: Chichester, 1998.

KARUSKI, C. de M. **Avaliação da atividade amebicida do extrato aquoso de própolis verde sobre trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii***. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

KELLERMANN, G. **Nanoagregados em matrizes vítreas**. 2003. 124f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

KHAN, N. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 277-285, 2003.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, Wiley Library, n. 4, p. 564-595, Jul. 2006.

KHAN, N. A. Acanthamoeba and the blood-brain barrier: the breakthrough. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1051-1057, Sep. 2008.

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, p. 1611-1616, 2009.

KITZMANN, A. S.; GOINS, K. M.; SUTPHIN, J. E.; WAGONER, M. D. Keratoplasty for treatment of Acanthamoeba keratitis. **Ophthalmology**, Elsevier, v. 116, n. 5, p. 864-869, May 2009.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados Estabilizados com Álcool Cetílico Etoxilado e Propoxilado Contendo Fluconazol Potencialmente Ativo Contra Esporotricose**. 2007. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

KNOWLES, J. R. ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

KRISTENSSON, K.; MASOCHA, W.; BENTIVOGLIO, M., Chapter 2 – Mechanisms of CNS invasion and damage by parasites. **Handbook of Clinical Neurology**, Elsevier, v. 114, p. 11–22, Jul. 2013.

LEANPOLCHAREANCHAI, J.; PADOIS, K.; FALSON, F. BAVOVADA, R.; PITHAYAYANUKUL, P. Microemulsion system for topical delivery of thai mango seed kernel extract: development, physicochemical characterisation and ex vivo skin permeation studies. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 107-129, Oct. 2014.

LEE, J. E.; OUM, B. S.; CHOI, H. Y.; YU, H. S.; LEE, J. S. Cysticidal effect on Acanthamoeba and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. **Cornea**, Wolters Kluwer, v. 26, n. 6, p. 736-741, Jul. 2007.

LLLINGWORTH, C. D.; COOK, S. D. Acanthamoeba keratitis. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, n. 6, p. 493-508, May / Jun. 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, second ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008.

LORENZO-MORALES J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, v. 22, n. 10, Feb. 2015.

LORENZO-MORALES J.; NAVARRO, C. M. M.; ARENCIBIA, A. L.; MONTIEL, F. A.; PIÑERO, J. E.; VALADARES, B. Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, Apr. 2013.

MACLEAN, R. C.; HAFEZ, N.; TRIPATHI, S., CHILDRESS, C. G.; GHATAK, N. R.; MARCIANO-CABRAL, F. Identification of Acanthamoeba sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease journal**, Elsevier, v. 57, n. 3, p. 289-294, 2007.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 273-307, Apr. 2003.

MARTINEZ, A. J. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. **Reviews of Infectious Diseases Journal**, v. 13 p. S399-402, Mar. / Apr. 1991. Suplemento.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, Pittsburgh, v. 7, n. 1, p. 583-598, Jan. 1997.

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, n. 41, p. R635-R666, Sep. 2006.

MATOS, F. J. de A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 2. edição. Fortaleza: EUFC, 1994.

MCLAUGHLIN-BORLACE, L.; STAPLETON, F.; MATHESON, M.; DART, J. Bacterial Biofilme on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. **Journal of Applied Microbiology**, Wiley, v. 84, n. 5, p. 827-838, May 1998.

MELO, J. O. de; BITENCOURT, T. A.; FACHIN, A. L.; CRUZ, E. M. O. C.; JESUS, H. C. R. de; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK; M. de F.; FRANCA, S. de C.; BELEBONI, R. O.; FERNANDES, R. P. M.; BLANK, A. F.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 110-115, Oct. 2013.

MELO; J. O. de; FACHIN, A. L.; RIZO, W. F.; JESUS, H. C.; BLANK M. F. A.; ALVES, P. B.; MARINS, M. A.; FRANÇA, S. C.; BLANK, A. F. Cytotoxic effects of essential oils from three *L. gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 2691-2697, Apr. 2014.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *L. gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 129, n. 3, p. 391-397, Jun. 2010.

MENDONÇA, C. R. B. **Desenvolvimento de Metodologias para Análise Direta de Óleos Vegetais Empregando Microemulsões de Água em Óleo e Meios não-Aquosos**. 2005. 206f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, Tabriz, v. 3, n. 1, p. 63-71, Feb. 2013.

MOHAMMADINIA, M.; RAHMANI, S.; ESLAMI, G.; GHASSEMI-BROUMAND, M.; AGHAZADH AMIRI, A.; AGHAIE, Gh; TABATABAEE, S. M.; TAHERI, S.;

BEHGOZIN, A. Contact lens disinfecting solutions antibacterial efficacy: comparison between clinical isolates and the standard ISO ATCC strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Eye**, London, v. 26, n. 2, p. 327-330, Feb. 2012.

MORAES, J. R. de. **Avaliação Reológica de Nanoemulsões para Sistema Transdérmico de Liberação de Fármacos**. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2008.

MOTTA NETO, R.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, V. S.; MELO, M. C. N. de; CARVALHO, C. B. M.; GUIMARÃES, S. B.; PESSOA, O. D. L.; SILVA, S. L.; SILVA, S. F. R.; VASCONCELOS, P. R. L. The essential oil from *L. gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 261-266, Apr./May, 2010.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**, 2nd Edition. Wiley, 1999.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan. / mar. 2007.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 12ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

NEVES, I. A.; OLIVEIRA, J. C. S. de; CAMARA, C. A. G. da; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical composition of the leaf oils of *L. gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. **Journal of Essential Oil Research**, Taylor & Francis, v. 20, n. 2, p. 157-160, Mar. 2008.

NGUYEN, T. H.; WEISENTHAL, R. W.; FLORAKIS, G. J.; REIDY, J. J.; GASTER, R. N.; TOM, D. Penetrating keratoplasty in active Acanthamoeba keratitis. **Cornea**, v. 29, n. 9, p. 1000–1004, Sep. 2010.

NICOLETTI, C.; FRASSON, A. Formas de Liberação Controlada: Revisão Bibliográfica e Avaliação Comparativa da Qualidade de Comprimidos Retard de Nifedipina 20mg de Referência e Similar. **Revista Contexto & Saúde**. Ijuí, v. 5, n. 10, p. 65-74, jan. / jun. 2006.

NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current Status of Acanthamoeba in Iran: A Narrative Review Article. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 10, n. 2, p. 157-163, Apr. / Jun. 2015.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterizacao química e atividade biológica do óleo essencial de Lippia alba cultivada no Paraná. **Revista de Ciencia Farmaceutica Basica e Aplicada**. São Paulo, v. 28, n. 3, p. 273-278, 2007.

OBEID, W. N.; ARAÚJO, R. de; VIEIRA, L. A.; MACHADO, M. A. de C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 66, n. 6, p. 876-880, nov. / dez. 2003.

OHNISHI, K. SAKAMOTO, N.; KOBAYASHI, K.; IWABUCHI, S.; UCHIYAMA, F. N.; AJISAWA, A.; YAMAUCHI, Y.; TAKESHITA, N.; YAMAMOTO, Y.; TSUNODA, T.; YOSHIMURA, Y.; TACHIKAWA, N.; UEHIRA, T. Subjective adverse reactions to metronidazole in patients with amebiasis. **Parasitology International**, Elsevier, v. 63, n. 5, p. 698–700, Oct. 2014.

OLIVEIRA, A. G. de. **Caracterização da distribuição do tamanho de gotas em emulsões água e óleo utilizando diferentes técnicas de medição**. 2010. 144f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2010.

OLIVEIRA, C. E. L. de. **Caracterização do Óleo Essencial de *L. gracilis* Schum e de seus Principais Constituintes por Termogravimetria**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

OLIVEIRA, A. G. de; SCARPA, M. V.; BUENO, J. H. F.; EVANGELISTA, R. C.; Micro e nanocápsulas: um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 14, p. 37-49, 1992.

OLIVEIRA, A. G. de; 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**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 131-138, fev. 2004.

OLIVEIRA, C. E. L. de; CREMASCO, M. A. Determination of the vapor pressure of *L. gracilis* Schum essential oil by thermogravimetric analysis. **Thermochimica Acta**, Elsevier, v. 577, p. 1-4, Feb. 2014.

OMAÑA-MOLINA, M.; VANZZINI-ZAGO, V.; HERNANDEZ-MARTINEZ, D.; GONZALEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; RAMIREZ-FLORES, E.; OREGON-MIRANDA, E.; LORENZO-MORALES, J.; MARTINEZ-PALOMO, J. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 873-878, Feb. 2016.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Ocular Surface**, v. 8, n. 2, p. 70-79, Apr. 2010.

PESSOA, O. D. L., CARVALHO, C. B. M. de; SILVESTRE, J. O. V. L.; LIMA, M. C. L.; M NETO, R.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracilis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 712-714, Dec. 2005.

PESTANA, K. C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral. Estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica**. 2009. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

PIRES, P. A. R. **Síntese e propriedades de soluções de tensoativos catiônicos derivados de (3-Dimetilaminopropil)amidas de ácidos carboxílicos**. 2002. 163p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2,1990.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S.; Characterization of a new *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 626-636, Nov. / Dec. 2013.

REIS, M. Y. de F. A. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico**. 2014. 44f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

RESENDE, Q. G. M. **Estudo da formação de microemulsões contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) osbeck**: efeito dos cotensoativos e avaliação da interação das microemulsões com modelo de estrato córneo. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

RÓDIO, C. **Atividade de *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) frente a *Acanthamoeba castellanii***. 2008. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 4^o ed. Wiley, 2012.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista de Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica/RJ, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, jan. / dez. 2007.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica/RJ, v. 25, n. 1-2, p. 73-85, 2006.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438-445, 2005.

SAHOO, S.; PANI, N. R.; SAHOO, S. K. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, Characterization and Evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier, v. 120, p. 193–199, Ago. 2014.

SALAGER, J. L. Formulaci3n, composici3n, y fabricaci3n de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. **Cuaderno FIRP**, S747-B. Universidad de Los Andes. M3rida, Venezuela, 1999

SANTIS, A. **Formas Farmac3uticas Semi-S3lidas de Uso T3pico Contendo Nifedipina**: Desenvolvimento Gal3nico e Avalia33o Biofarmacot3cnica. 2008. 157f. Disserta33o (Mestrado em Ci3ncias Farmac3uticas) – Faculdade de Farm3cia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SANTOS, I. G. de A.; SCHER, R.; ROTT, M. B.; MENEZES, L. R.; COSTA, E. V.; CAVALCANTI, S. C.; BLANK, A. F.; AGUIAR, J. dos S.; SILVA, T. G. da; DOLABELLA, S. S. Amebicidal Activity of the Essencial Oils of *Lippia spp.* (*Verbenaceae*) against *Acanthamoeba Polyphaga* *Ttrophozoites*. **Parasitology Resourch**, Springer, v. 115, n. 2, p. 535-540, Feb. 2016.

SANTOS; J. S. dos.; MELO, J. I. M. de; ABREU, M. C. de; SALES, M. F. de. *Verbenaceae sensu stricto* na regi3o de Xing3: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodrigu3sia** – Revista do Jardim Bot3nico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 985-998, nov. 2009. Fasc3culo.

SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R. PESSOA, E. de S.; NEPA, H. B. dos S.; PAZ, C. D. da; SOUZA, A. V. V. de. Estudos dos constituintes qu3micos e atividade antibacteriana do 3leo essencial de *L. gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “*in vitro*” **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 277-280, jul./set. 2014.

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; KUMAR, J.; QIU, J.; PLAUNT, A. G.; NEWBURG, D. S.; PANJWAI, N. Milk components inhibit *Acanthamoeba* – induced cytophatic effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science Invest**, v. 49, n. 3, p. 1010-1015, 2008.

SAUTER; I. P. **Avalia33o da Atividade Amebicida do 3leo Essencial de *Pterocaulon polystachyum* Frente à *Acantamoeba polyphaga***. 2011. 95f. Disserta33o (Mestrado em Microbiologia Agr3cola e do Ambiente) – Instituto de Ci3ncias B3sicas da Sa3de, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**: fundamentos te3ricos e pr3ticos. Sao Paulo: Artliber, 2006.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The journal of Physical chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677-1680, Oct. 1959.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. **Drug Resistance Updates Journal**, v. 7, n. 1, p. 41-51, Feb. 2004.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 9, p. 1001–1027, Aug. 2004.

SEAL, D. V. Acanthamoeba keratitis update - incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye**, London, v. 17, n. 8, p. 893–905, Nov. 2003.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C. de; HENRIQUES, M. das G. M. O.; RAMOS, M. F. de S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 16, p. 38-43, set. / out. 2000

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 6, Jan. 2012

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. War of the microbial worlds: who is the beneficiary in Acanthamoeba-bacterial interactions? **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 130, n. 4, p. 311-313, Apr. 2012.

SILVA, A. R. B. da. **Biofilmes e lentes de contacto**. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SILVA, G. B. da; SCARPA, M. V.; CARLOS, I. Z.; QUILLES, M. B.; LIA, R. C.; EGITO, E. S. do; OLIVEIRA, A. G. de. Oil-in-water biocompatible microemulsion as a carrier for the antitumor drug compound methyl dihydrojasmonate. **International Journal of Nanomedicine**, Dovepress, v. 10, p. 585-594, Jan. 2015.

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

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, Elsevier, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, May 2008.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 1999.

SINKO, P. J. **Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.

SOUZA, A. V.V.; SANTOS, U. S.; SILVA, F. P.; SOUZA, D. D.; SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, F. J. V. Produção e rendimento de óleo essencial de alecrim de tabuleiro em função da adubação orgânica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, S5985-S5990, jul. 2012. Suplemento.

SRIPRIYA, R.; RAJA, K. M.; SANTHOSH, G.; CHANDRASEKARAN, M.; NOEL, M. The effect of structure of oil phase, surfactant and co-surfactant on the physicochemical and electrochemical properties of bicontinuous microemulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, Elsevier, v. 314, n. 2, p. 712–717, Oct. 2007.

SYED, H. K.; PEH, K. K. Identification Of Phases Of Various Oil, Surfactant/Co-Surfactants And Water System By Ternary Phase Diagram. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 71, n. 2, p. 301-309, Mar./Apr. 2014.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, H. D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do Óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 1, p. 1-5, jan. / mar. 2005

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

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHO, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, Elsevier, v. 60, n. 6, p. 399-405, Dec. 2012.

TU, E. Y.; JOSLIN, C. E.; NIJM, L. M.; FEDER, R. S.; JAIN, S.; SHOFT, M. E. Polymicrobial Keratitis: *Acanthamoeba* and Infectious Crystalline Keratopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, n. 1, p. 13-19.e2, Jul. 2009.

VENUGOPAL, J. R.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Current Pharmaceutical Design**, Bentham Science, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VISVESVARA, G. S.; MAGUIRE J. H. Pathogenic and opportunistic free-living amebas: *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practices**, Elsevier, v. 2, p. 1114-1125, 2006.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H., SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology Journal**, v. 50, n. 1, p. 1-26, Jun. 2007.

WEISZHÁR, Z.; CZÚCZ, J.; RÉVÉSZ, C.; ROSIVALL, L.; SZEBENI, J.; ROZSNYAY, Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Elsevier, v. 45, n. 4, p. 492-498, mar. 2012.

WRIGHT, P.; WARHURST, D., JONES, B. R. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. **British Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 10, p. 778-82, Oct. 1985.

WUTTIKUL, K.; BOONME, P. Formation of microemulsions for using as cosmeceutical delivery systems: effects of various components and characteristics of some formulations. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 3, p. 254-262, Jun. 2016.

ZHENG, M.; WANG, Z.; LIU, F.; MI, Q.; WU, J. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. **Colloid and Surfaces A: Phisicochemical and Engineering Aspects**, Elsevier, v. 385, n. 1-3, p. 47-54, Jul. 2011.