



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JONATAS LOBATO DUARTE

**Obtenção e caracterização de nano-emulsões contendo o óleo
essencial de *Matricaria chamomilla* L.**

Macapá
2019

JONATAS LOBATO DUARTE

**Obtenção e caracterização de nano-emulsões contendo o óleo
essencial de *Matricaria chamomilla* L**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Caio Pinho Fernandes

Macapá

2019

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Jonatas Lobato Duarte

Orientador(a): Dr. Caio Pinho Fernandes

Dr. Caio Pinho Fernandes

Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Dr. Fabio Rocha Formiga

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Dr. Gabriel Araújo da Silva

Universidade do Estado do Amapá, UEAP

Data: 25/06/2019

Dedico este trabalho a toda a minha família, em especial aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indiretamente para que este trabalho pudesse ser desenvolvido e finalizado.

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família por todo o apoio que sempre me foi dado. Aos meus pais adotivos Miguel e Maria, que sempre forneceram todo o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar aos estudos e não mediram esforços para que nosso sonho se realizasse. Aos meus pais biológicos Maria e José que sempre torceram e apoiaram nas decisões que tomei. Amo vocês.

A toda a minha família de Macapá por todo estímulo e apoio a mim dispensados. Muito obrigado, tios e tias.

Ao Caio, por toda a paciência e dedicação para comigo e com esse trabalho. Muito obrigado por tudo que você me ensinou ao longo dos anos, ensinamentos que serviram tanto para meu crescimento pessoal e profissional. Foi/é um privilégio trabalhar com você. Muito obrigado.

Aos professores do laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica Rodrigo, Gisele, Raquel e Anna por todo carinho, amizade e conversas.

Aos meus amigos do laboratório, em especial a Desirane e a Lisset, por toda a parceria que tivemos nesses anos, obrigado por sempre escutar meus lamentos (rs) e me ajudar nos piores momentos.

A todos os meus amigos que deixaram a caminhada mais leve e sempre, em especial a Anna Elayne, Ana Cassia, Ana Barbara e Yanna. .

Ao laboratório de pesquisa em fármacos, em especial ao Prof. E querido amigo José Carlos Tavares, obrigado por todo apoio e palavras de incentivo.

Ao laboratório de Biologia experimental e Bios prospecção da Universidade Federal do Oeste do Pará, em especial ao técnico Adenilson e a Prof. Rosa por todo apoio nas análises de cromatografia em fase gasosa.

Ao laboratório de Bromatologia e controle de qualidade da UNIFAP, em especial ao Prof. Fabio Oliveira e ao William que me auxiliaram nos testes antibacterianos.

A todos os colegas de turma do PPGCF em especial a Vaneska, o Franklin e o Alberto.

A Universidade Federal do Amapá pelo apoio concedido para realização desta pesquisa e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Matricaria chamomila</i> L.....	1
1.1.1	Constituintes químicos.....	2
1.1.2	Atividades biológicas.....	5
1.1.2.1	Extratos.....	5
1.1.2.2	Óleo essencial.....	7
1.1.3	Potencial em alimentos.....	9
1.2	NANO-EMULSÕES.....	10
1.2.1	Métodos de obtenção.....	12
1.2.1.1	Inversão de fases.....	12
1.2.1.2	Auto nano-emulsificação.....	12
1.2.2	Estratégias para a obtenção.....	13
1.3	NANOESTRUTURAS A BASE DE <i>M. chamomilla</i>	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	17
3.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. chamomilla</i> (OEC).....	17
3.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	17

3.3.1	Auto-nanoemulsificação.....	17
3.3.2	Nano-emulsões contendo tensoativos.....	18
3.4	PROPRIEDADES MOLECULARES E FÍSICO-QUÍMICAS <i>IN SILICO</i>	18
3.5	OBTENÇÃO DAS NANO-EMULSÕES.....	19
3.5.1	Auto nano-emulsificação.....	19
3.5.1	Nano-emulsificação com tensoativos não iônicos.....	19
3.5.2.1	Avaliação da formação e estabilização de nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.....	19
3.5.2.2	Avaliação da formação e estabilização de nano-emulsões preparadas com pares de tensoativos não iônicos.....	19
3.5.4	Avaliação da influência da relação tensoativo/óleo na formação e estabilização de nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos.....	20
3.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES.....	20
3.6.1	Aparência visual.....	20
3.6.2	Distribuição do tamanho de gotícula.....	20
3.7	ESTABILIDADE.....	21
3.7.1	Física/térmica.....	21
3.8	RELAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	21
3.9	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	22
3.9.1	Microrganismos.....	22
3.9.2	Preparo do inóculo.....	23
3.9.3	Determinação da concentração inibitória mínima e concentração mínima bactericida.....	23

3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO 1	Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações feitas com Polissorbatos individuais.....	62
ANEXO 2	Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações feitas com pares de tensoativos.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exsicata da espécie <i>Matricaria chamomilla</i> L.....	1
Figura 2	Mecanismo de formação do camazuleno a partir da matricina.....	3
Figura 3	Rota biosintética do (E)-beta-Farneseno.....	4
Figura 4	Rota biosintética do bisabolol e óxidos de Bisabolol A e B.....	4
Figura 5	Capítulos florais de <i>M. chamomilla</i>	17
Figura 6	Gráficos de distribuição do tamanho de gotícula dos sistemas obtidos por meio da auto nano-emulsificação.....	29
Figura 7	Aspecto das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.....	35
Figura 8	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.....	37
Figura 9	Gráficos de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão feita com polissorbato 20 (RTO 1).....	39
Figura 10	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20 e monooleato de sorbitano.....	40
Figura 11	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20 e trioleato de sorbitano.....	42
Figura 12	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 e monooleato de sorbitano.....	44
Figura 13	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 e trioleato de sorbitano.....	45
Figura 14	Tamanho de partícula e índice de polidispersão da nano-emulsão otimizada submetida a rampa linear de aumento da temperatura.....	47
Figura 15	Tamanho de gotícula e IPd da nano-emulsão otimizada submetida a influência de ciclos de refrigeração/restabelecimento de temperatura ambiente.....	48
Figura 16	Variação da relação de metabólitos secundários na nano-emulsão otimizada.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição química do óleo essencial de camomila utilizado na auto nano-emulsificação.....	24
Tabela 2 -	Propriedades moleculares e físico-químicas <i>in silico</i> do óleo essencial de camomila utilizado na auto nano-emulsificação.....	26
Tabela 3 -	Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPd) e variação do tamanho (VT) de gotículas das formulações obtidas por método de auto nano-emulsificação.....	28
Tabela 4 -	Composição química do óleo essencial de camomila utilizado na preparação de nano-emulsões com tensoativos não iônicos.....	31
Tabela 5 -	Variação do tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.....	36
Tabela 6 -	Variação do tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com pares de tensoativos não iônicos.....	46
Tabela 7 -	Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida da nano-emulsão e do OEC.....	49

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American type culture collection
BHT	Hidroxitolueno butilado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração micelar crítica
DAG	Desordem de ansiedade generalizada
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDL	Espalhamento dinâmico da luz
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipofilo
EI	Impacto de elétrons
ET	Equivalente Trolox
FRAP	Poder de redução do íon ferro
GPP	Pirofosfato de geranila
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
IG	Incremento no tamanho da gotícula
IPd	Índices de polidispersão

IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Índice de retenção
MDA	Malodialdeído
MS	Monooleato de sorbitano
NIST	Nacional Institute of Standards and Technology
OEC	Óleo essencial de camomila
P20	Polissorbato 20
P80	Polissorbato 80
P81	Polissorbato 81
P85	Polissorbato 85
PIC	Phase inversion composition
PIT	Phase inversion temperature
PP	Pirofosfato
RG	Redução no tamanho da gotícula
RMS	Relação de metabolitos secundários
RTO	Relação tensoativo/óleo
SSPM	Síndrome pré-menstrual
TS	Trioleato de sorbitano
VT	Variação de tamanho

Obtenção e caracterização de nano-emulsões contendo o óleo essencial de *Matricaria chamomilla* L.

Introdução: *Matricaria chamomilla* L. é uma espécie vegetal utilizada para o tratamento de diversas afecções e como planta alimentícia. Seu óleo essencial possui uma coloração azulada característica devido a presença do sesquiterpeno camazuleno. No entanto, devido a baixa solubilidade em água seu uso em sistemas alimentícios, como matrizes aquosas, é um desafio. **Objetivo:** Diante disso o objetivo deste trabalho foi obter nano-emulsões do tipo O/A contendo o óleo essencial de camomila. **Material e métodos:** O OEC foi obtido por hidrodestilação usando aparato do tipo Clevenger e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram preparadas nano-emulsões livres de tensoativo, com tensoativos derivados do polissorbato (polissorbato 20, 80, 81 ou 85) e com pares de tensoativos (polissorbato 20/monooleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano e polissorbato 80/monooleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano). Todas as formulações obtidas foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotícula e índice de polidispersão. Após a escolha da nano-emulsão otimizada, análises adicionais de estabilidade foram realizadas. A atividade antimicrobiana desta nano-emulsão frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi avaliada através do teste de microdiluição e também foi verificada a influência do armazenamento na relação de metabólicos secundários. **Resultados e discussão:** A composição fitoquímica do óleo essencial apresentou diversos sesquiterpenos, sendo encontrados os óxidos de α -bisabolol A e B, α -bisabolol, camazuleno e farneseno. As nano-emulsões livres de tensoativos apresentaram inicialmente um diâmetro médio de 185,3 a 238,8 nm (dia 0) e, após 1 dia, de 227,7 a 268,8 nm. Em relação as nano-emulsões preparadas com pares de tensoativos, foram obtidos alguns sistemas com boa distribuição de gotícula e baixa variação, especialmente em pares que utilizaram polissorbato 20. No entanto, considerando todos os parâmetros avaliados, o sistema que apresentou os melhores resultados foi a nano-emulsão obtida com polissorbato 20 (relação tensoativo:óleo = 1), além da vantagem de utilizar apenas um tensoativo não iônico. Portanto, foi escolhida como a nano-emulsão otimizada, apresentando satisfatória estabilidade térmica. Foi observado que a nano-emulsificação induziu maior proteção aos óxidos de bisabolol, quando comparados ao camazuleno. Em relação ao teste antibacteriano, se verificou que a nano-emulsão otimizada apresentou uma melhor performance, quando comparada ao óleo essencial bruto. **Conclusão:** Dessa forma, o presente trabalho demonstrou a possibilidade de obtenção de nano-emulsões a base do óleo essencial de camomila por diferentes métodos e composições, sugerindo possíveis mecanismos envolvidos e diversas vantagens e potencialidades desses novos sistemas coloidais a base de uma importante matéria-prima vegetal.

Palavras-Chave: Espalhamento dinâmico da luz; óleo volátil; oxido de bisabolol.

Agradecimentos: UNIFAP, CAPES, UFOPA.

Obtention e characterization of nano-emulsions containing the essential oil of
Matricaria chamomilla L.

Introduction: *Matricaria chamomilla* L. is a species used for the treatment of several diseases and as a food plant. The essential oil of this species possesses a characteristic blue color due the presence of sesquiterpene chamazulene. Notwithstanding, due to low solubility in water its use in food systems, such as aqueous matrix, is a challenge.

Objectives: Then, this work intends to obtain O/A nano-emulsions containing the EOC.

Methodology: EOC was obtained by hidrodistillation using a Clevenger apparatus and analyzed by GC-MS. Free-surfactants nano-emulsions, polysorbates (P20, 80, 81 and 85) based nanoemulsions and sets of non-ionic surfactant pairs. They were characterized by DLS to measure the particle size and the polydispersity index. An optimized nano-emulsion was chosen and submitted to additional stability analyses. The antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was performed through the microdilution method and the influence of storage in the SMR was check.

Results and discussion: Phytochemical composition of EOC presented several sesquiterpenes, being α -bisabolol oxides A and B, α -bisabolol, chamazulene and farnesene the major constituents. The free surfactant nano-emulsions initially had an average diameter of 185.3 to 238.8 nm (day 0) and, after 1 day, of 227.7 to 268.8 nm. In relation to the nano-emulsions prepared with pairs of surfactants, some systems with good droplet distribution and low variation were obtained, especially in pairs that used polysorbate 20. However, considering all the evaluated parameters, the system that presented the best results was the nano-emulsion obtained with polysorbate 20 (surfactant-oil ratio = 1), in addition to the advantage of using only a non-ionic surfactant. Therefore, it was chosen as the optimized nanoemulsion, presenting satisfactory thermal stability. It was observed that the nano-emulsification induced greater protection to the bisabolol oxides when compared to the chamazulene. In relation to the antibacterial test, it was verified that the optimized nano-emulsion presented a better bioactivity when compared to the raw essential oil.

Conclusion: The present work demonstrated the possibility of obtaining nano-emulsions based on the essential oil of chamomile by different methods and compositions, suggesting possible mechanisms involved and several advantages and potentialities of these new colloidal systems based on an important raw material.

Keywords: Dynamic light scattering; volatile oil; bisabolol oxide.

Acknowledgements: UNIFAP, CAPES, UFOPA.

1.1 *Matricaria chamomilla* L.

A espécie vegetal *Matricaria chamomilla* é descrita desde tempos antigos como uma planta medicinal. Ela tem sido utilizada popularmente para o tratamento de diversas afecções, como febre do feno, inflamação, espasmos musculares, distúrbios menstruais, insônia, úlceras, feridas, distúrbios gastrointestinais, dores reumáticas e hemorroidas (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; LUMPERT; KREFT, 2017). Popularmente conhecida como camomila (do português) ou camomille (do inglês), esse nome é derivado de duas palavras gregas: *Khamai*, que significa no chão, e *melon*, que significa maçã (DAS, 2015). Pertence ao gênero *Matricaria* e à família Compositae (antes Asteraceae Bercht. & J. Presl) (THE PLANT LIST, 2013).

É uma planta herbácea anual, nativa da Europa e Ásia Ocidental (MCKAY; BLUMBERG, 2006), que possui raízes finas em forma de fuso, haste ramificada e ereta, crescendo até uma altura de 10-80 cm. As folhas são longas e estreitas, bi- ou tripinadas. Os capítulos florais são inseridos separadamente e têm um diâmetro de 10 a 30 mm e são pedunculados e heterogâmicos. Os flósculos são tubulares, amarelos dourados com 5 dentes e 1,5 - 2,5 mm de comprimento, terminando sempre em um tubo glanduloso. O receptáculo possui de 6-8 mm de largura, plano e cônico no início, em forma de cone mais tarde, oco e sem paleá (Figura 1) (SINGH et al., 2011).

Figura 1 - Exsicata da espécie *Matricaria chamomilla* L.



É uma espécie que cresce naturalmente no norte e centro da Europa, especialmente nos países do leste europeu e mediterrâneo, norte da África e Estados Unidos. Por ser uma espécie de grande consumo, o cultivo da espécie é extensamente praticado em diversos países a fins de suprir a demanda (TSIVELIKA et al., 2018)

Diversos compêndios oficiais possuem monografias da camomila como a farmacopeia europeia, comissão E, organização mundial da saúde (WHO), farmacopeia britânica, farmacopeia norte-americana, entre outras (FRANKE; SCHILCHER, 2015). A quinta edição da farmacopeia brasileira, no seu segundo suplemento, possui 3 monografias para a espécie. A da droga vegetal, de acordo com o texto, é composta por capítulos florais estabilizados da planta, contendo no mínimo 0,4% de óleo volátil e no mínimo 0,25% de apigenina-7-O-glucosídeo. Já a da tintura, também obtida a partir dos capítulos florais secos, deve conter no mínimo 0,025% de apigenina-7-O-glucosídeo, e a do óleo volátil obtido por hidrodestilação a partir das inflorescências frescas ou secas, deve conter no mínimo 0,4 % de óleo volátil (BRASIL, 2017).

1.1.1 Constituintes químicos

Por ser uma espécie vegetal utilizada há milhares de anos e que possui a utilização popular bem documentada, a camomila tem sua composição química extensamente estudada. Os flavonoides são um grupo de destaque na espécie (RAAL et al., 2012; ALIBABAEI et al., 2014; GARBOSSA et al., 2016). Ácidos fenólicos e flavonoides, como ácido caféico e quercetina, respectivamente, além dos glicosídeos de miricetina, luteonina e apigenina foram encontrados no decocto de amostras comerciais de *M. chamomilla* (CALEJA et al., 2015).

As cumarinas também são um grupo de destaque na espécie. Petrulová-Poracká et al. (2013) descreveram a presença de cumarinas glicosiladas e agliconas como: esquimina, dafinina, dafinetina, ácidos (Z) e (E)-b-D-glicopiranosiloxi-4-metoxicinâmico, umbeliferona e herniarina nos extratos hidrometanólicos de folhas e de capítulos florais.

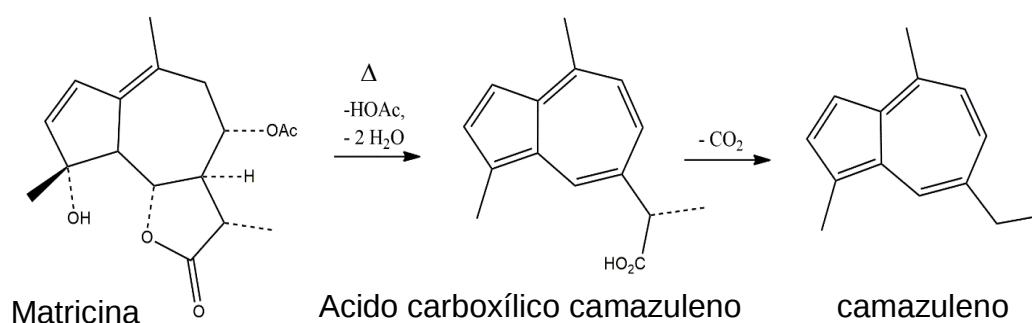
Em infusões obtidas de suas flores, foram identificados diversos compostos fenólicos, sendo os majoritários o ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, glicosídeos de quercetina, luteonina e apigenina, e galactosídeos de quercetina (RAAL et al., 2012). No decocto das flores foram encontrados ácidos fenólicos como o ácido gálico, protocatequico, ácido caféico e ácidos derivados do ácido quínico, além dos flavonoides rutina, narigenina, quercetina, canferol, epigenina e cirsiolol (JABRI et

al., 2017). Mao et al. (2016) identificaram a presença da apigenina-7-glicosídeo e 7-metoxicumarina no extrato seco padronizado dos capítulos florais.

No óleo essencial das partes aéreas podem ser encontrados alguns monoterpenos como o canfeno, sabineno, limoneno, 1,8-cineol, canfora e α -pineno (KAZEMI, 2015). No entanto, destacam-se os sesquiterpenos, que são a principal classe de terpenos que compõe esse óleo, como o óxido de bisabolol A, óxido de bisabolol B, α -bisabolol, (*E*)- β -farneseno e (-)-germacreno, (IRMISCH et al., 2012; RAAL et al., 2012; ABDELHAMEED et al., 2017), além do camazuleno (RAHMATI et al., 2011; GAWDE et al., 2014; TOMIČ et al., 2014).

O óleo essencial dos capítulos florais possui uma coloração azulada, com odor aromático característico (RAHMATI et al., 2011; TOMIČ et al., 2014; WESOŁOWSKA; GRZESZCZUK; KULPA, 2015). Essa aparência deve-se principalmente ao camazuleno, que é uma substância produzida a partir da decomposição da matricina. Extremamente instável, a matricina se degrada com o aquecimento no processo de extração do óleo essencial, eliminando água e ácido acético e dando origem ao precursor imediato do camazuleno, o ácido carboxílico camazuleno, que com uma descarboxilação origina o camazuleno (Figura 2) (DEWICK, 2002; DAS, 2015).

Figura 2 - Mecanismo de formação do camazuleno a partir da matricina.

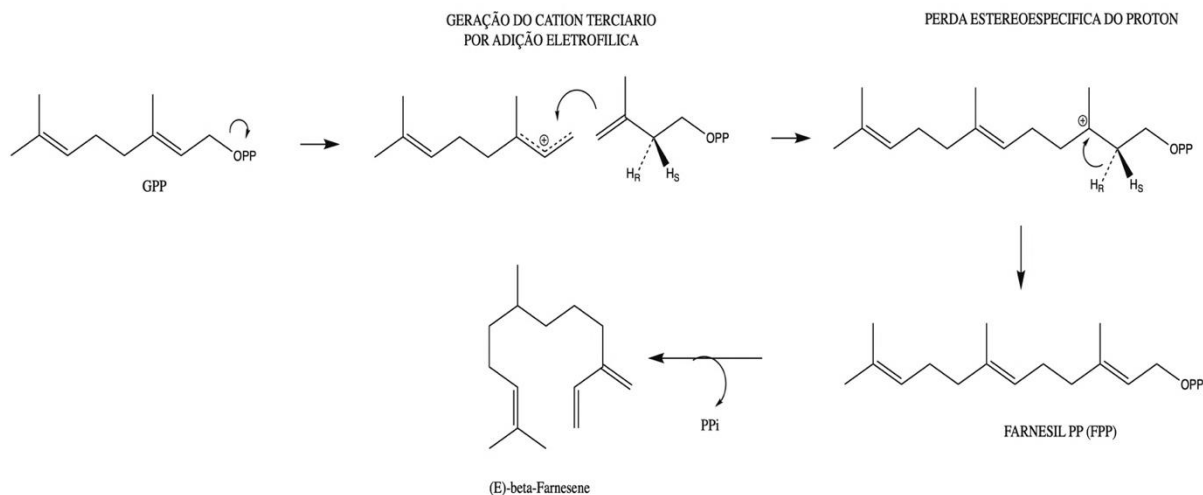


Fonte: (DEWICK, 2002).

De acordo com Das (2014), além do camazuleno, os terpenos característicos mais importantes da espécie são o farneseno, bisabolol e os óxidos de Bisabolol A e B. Os sesquiterpenos tem uma origem biosintética comum, através das vias do mevalonato e do deoxilulose fosfato, se formando a partir da adição de uma molécula de C5-IPP a uma molécula de pirofosfato de geranila (GPP). A molécula de GPP será ionizada, com posterior formação de uma dupla ligação no carbono 2 dando origem a molécula pirofosfato de

farnesila (FPP). A partir do FPP, o (E)-beta-farneseno será formado pela eliminação de um difosfato (PP) do FPP (Figura 3) (DEWICK, 2002).

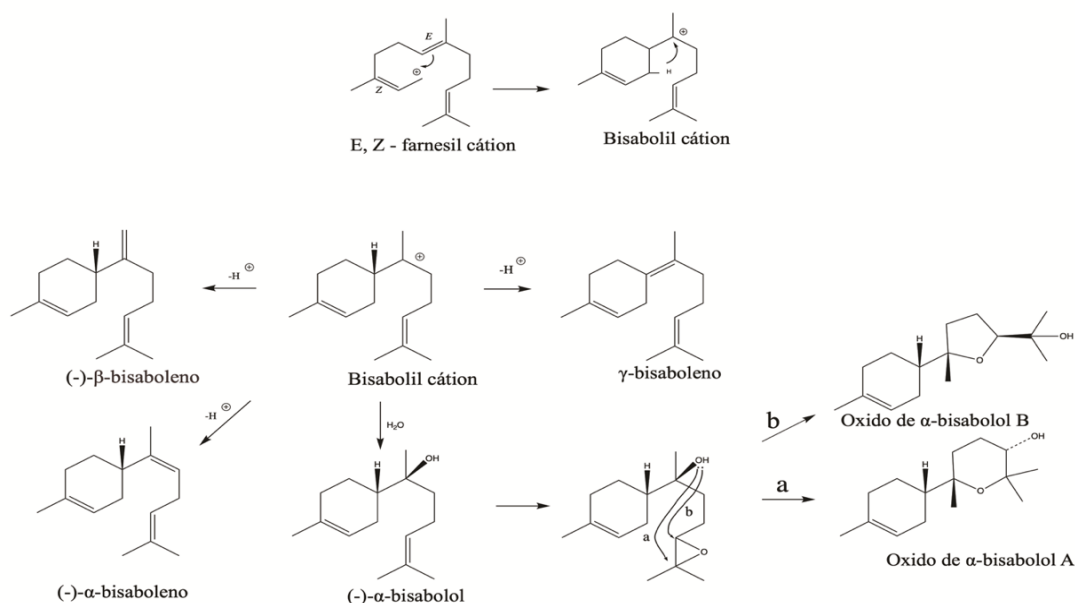
Figura 3 - Rota biosintética do (E)-beta-Farneseno.



Fonte: Adaptado de (DEWICK, 2002).

A partir da configuração estereoquímica Z do FPP, via ionização, temos a formação do cátion E,Z-farnesila, que a partir de uma ciclização dará origem ao cátion bisabolila. Este último através de diversas reações químicas dará origem aos sesquiterpenos (-)-β-bisaboleno, γ-bisaboleno, (-)-α-bisaboleno, (-)-α-bisabolol e os Óxidos de α-bisabolol A e B (Figura 4).

Figura 4 - Rota biosintética do Bisabolol e os óxidos de Bisabolol A e B



Fonte: Adaptado de (DEWICK, 2002)

1.1.2 Atividades Biológicas

1.1.2.1 Extratos

Em um modelo de isquemia em ratos Sprague-Dawley, o extrato metanólico dos capítulos florais apresentou um potencial neuroprotetor, evidenciado pela diminuição do estresse oxidativo nos animais tratados. Esse efeito foi demonstrado pela diminuição da lipoperoxidação lipídica e aumento dos níveis das enzimas superoxidodismutase, catalase, da glutathione e dos tióis totais (CHANDRASHEKHAR et al., 2010). Este mesmo extrato também demonstrou atividade antialérgica em camundongos Balb/c, comprovada através da diminuição da anafilaxia induzida pelo composto 48/80, que é capaz de causar degranulação de mastócitos, assim como a redução na liberação de mediadores alérgicos e inibição de prurido nos animais sensibilizados com o composto e tratados com o extrato na dose de 300 mg/kg (CHANDRASHEKHAR et al., 2011), demonstrando o potencial desta espécie para o tratamento de doenças alérgicas.

Asgharzade; Rabiei e Rafieian-kopaei (2015) ao avaliarem o efeito do extrato hidrometanólicos das folhas de camomila sobre ratos com comprometimento motor induzido por escopolamina, verificaram que os animais tratados apresentaram um aumento significativo da resistência motora quando comparados aos animais que não receberam o tratamento. Em outro estudo, o extrato hidroetanólico foi utilizado para avaliar se este melhorava a memória e diminuía o dano oxidativo em ratos com amnesia induzida por escopolamina. Observou-se que os animais tratados com o extrato nas doses de 200 e 500 mg/kg, durante 15 dias via oral, apresentaram sinais de reparo de memória. Além disso, foi observada a diminuição nos níveis do indicador de estresse oxidativo malodialdeído (MDA), sugerindo que o extrato possui um efeito neuroprotetor (ALIBABAEI et al., 2014).

Jabri et al. (2017) demonstraram que o decocto das flores de chamomila, em uma dose de 100 mg/kg, inibiu a absorção intestinal de glicose, além de proteger da obesidade os animais submetidos a uma dieta rica em gordura, diminuindo o ganho de gordura renal, hepática e abdominal, quando comparados a animais que tiveram acesso a uma dieta normal. Neste mesmo estudo, foi observado que os animais tratados com o decocto apresentaram uma diminuição no estresse oxidativo causado pela dieta, indicado pela diminuição significativa dos níveis de MDA nos tecidos dos rins e fígado. Também foi observado um retorno a níveis comparados ao grupo controle das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Em relação aos extratos, se pode observar que quanto maior a quantidade de substâncias fenólicas, maior a atividade antioxidante (FORMISANO et al., 2015). Através do método de DPPH, Roby et al. (2013) avaliaram o potencial redutor dos extratos metanólico, etanólico, hexânico e etérico (éter). Verificou-se que os extratos apresentaram EC₅₀ variando de 0.00022 a 0.0041, sendo os extratos metanólico e etanólico os que apresentaram as melhores atividades. Ao se avaliar o poder anti-radicalar, o extrato metanólico foi o que apresentou o melhor resultado, o que pode estar associado com a sua composição química, uma vez que possui maior compostos fenólicos que os outros extratos analisados.

Diversos estudos clínicos já foram realizados com a camomila. Sharifi et al. (2014) realizaram um ensaio clínico randomizado duplo-cego avaliando o efeito do extrato de camomila na intensidade dos sintomas da síndrome pré-menstrual (SSPM). No estudo, um grupo de mulheres receberam cápsulas contendo 100 mg de extrato de camomila e um grupo recebeu cápsulas contendo 250 mg de ácido menfenâmico, sendo a posologia de 3 cápsulas por dia, durante 5 dias, para os dois grupos. Ao final do tratamento, se observou que as participantes que utilizaram as cápsulas contendo o extrato de camomila apresentaram maior redução da intensidade geral de sintomas, assim como a redução dos sintomas psicológicos da SSPM, quando comparadas as que utilizaram as cápsulas contendo ácido menfenâmico, que é a droga padrão utilizada para o tratamento de SSPM. Quanto ao alívio dos sintomas físicos, não houve diferença significativa na redução destes, quando comparado o grupo que utilizou a camomila com o que utilizou o ácido menfenâmico.

Outro estudo clínico avaliou a segurança e eficácia de um óleo tradicional utilizado para o tratamento de osteoartrite de joelho e obtido através da mistura do extrato aquoso das flores da camomila com o óleo de sésamo, através de ensaio clínico randomizado. Não foram observados efeitos adversos locais ou sistêmicos. Além disso, o uso tópico do óleo diminuiu a necessidade de analgésicos pelos pacientes participantes do estudo (SHOARA et al., 2015).

A avaliação do uso de cápsulas contendo 500 mg de extrato seco das flores de camomila, padronizado em 6 mg de apigenina-7-glicosídeo, para o tratamento de desordem de ansiedade generalizada (DAG), foi efetuada em um estudo clínico randomizado. Os pacientes utilizaram cápsulas de 500 mg do extrato seco das flores de camomila, três vezes ao dia. Foi verificado que o uso das cápsulas foi considerado seguro e que houve uma melhora dos sintomas relacionados a DAG, além da melhora do bem-estar psicológico dos

pacientes, melhora nos níveis pressóricos e perfis de peso dos pacientes que utilizaram as capsulas contendo camomila (MAO et al., 2016).

1.1.2.2 Óleo essencial

O óleo essencial de camomila possui um amplo espectro de atividades descritas na literatura através de ensaios *in vivo* quanto *in vitro*. Can e colaboradores (2012) relataram o efeito psicoestimulante em camundongos, após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas administrado por via oral. Na dose de 100 mg/kg de óleo, verificou-se que o efeito estimulante foi semelhante a cafeína em uma dose de 25 mg/ml.

O óleo essencial extraído dos capítulos florais de camomila foi avaliado quanto ao seu poder analgésico e antiedematogênico através do modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Em uma dose de 100 mg/kg se pôde observar que o óleo essencial da camomila apresentou um efeito de analgesia de 45.9%, valor semelhante a droga padrão ibuprofeno (64.1%) na mesma dose. Verificou-se também que o óleo exibiu uma atividade dose-dependente frente ao edema de pata, tanto em um esquema profilático quanto terapêutico (TOMIČ et al., 2014).

A atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos também já foi descrita para a espécie *M. chamomilla*. Kazemi (2015) demonstrou a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido das partes aéreas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas através do método de difusão em disco e microdiluição. Através do teste de disco-difusão, se observou que na concentração de 1,0 µg/ml o microrganismo mais sensível ao óleo foi a bactéria gram-positiva *Bacillus cereus*. Foi observada uma zona de inibição de 36 mm, bem superior a zona de inibição do controle positivo, a estreptomicina, que apresentou zona de inibição de 22 mm. No teste de microdiluição, as bactérias gram positivas apresentaram os menores valores de concentração inibitória mínima (CIM), sendo que o melhor resultado foi o observado para *Staphylococcus aureus*, que obteve um valor de CMI de 0,011 µg/ml, bem inferior a CMI do controle positivo, estreptomicina, que apresentou um valor de 1 µg/ml. Os compostos majoritários deste óleo essencial também foram testados contra as mesmas bactérias. O composto que apresentou a maior zona de inibição no teste de disco difusão e menor concentração mínima inibitória foi o oxido de bisabolol na concentração de 1 µg/ml, sendo superior a zona de inibição da estreptomicina para todas as bactérias testadas.

O óleo essencial obtido das flores de camomila foi testado contra bactérias através do teste de difusão em disco. Após 24h da adição de 20 µl do óleo essencial, foi verificada zona de inibição de 31 mm frente a bactéria *Eschericia coli*, sendo semelhante a zona de

inibição do controle positivo ciprofloxacino na concentração de 5 µg/disco. Para a bactéria *S. aureus*, esta zona de inibição foi superior (40 mm) ao do controle positivo ciprofloxacino (STANOJEVIC et al., 2016).

O óleo essencial extraído das flores de *M. recutita* também mostrou atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos, como *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*, além de ação contra fungos saprofíticos oportunistas, como o *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*. Observou-se que o óleo inibiu o crescimento de forma dose-dependente em todos os fungos testados, sendo que na maior concentração testada, 80 µg/ml, houve inibição do crescimento de 100% dos fungos (JAMALIAN et al., 2012).

A atividade antioxidante do óleo essencial desta espécie também é reportada. Utilizando os métodos de DPPH e ABTS o poder redutor foi avaliado e o método do fosfomolibdênio para avaliar a capacidade antioxidante do camazuleno, um dos componentes majoritários do óleo essencial de camomila. O poder redutor do camazuleno (IC_{50} de $7,6 \pm 0,4$ mg/mL⁻¹) foi superior ao do α -tocoferol (IC_{50} de $238,9 \pm 3,6$ µg mL⁻¹) e semelhante ao BHT ($IC_{50} = 6,5 \pm 0,2$ µg mL⁻¹) e ao ácido ascórbico ($IC_{50} = 3,5 \pm 0,2$ µg mL⁻¹), demonstrando alta capacidade antioxidante desta substância. A capacidade antioxidante total desta substância feita através do teste do fosfomolibdênio mostrou uma IC_{50} de $6,4 \pm 0,1$ µg mL⁻¹, bem superior ao ácido ascórbico ($IC_{50} = 12,8 \pm 0,1$ µg mL⁻¹), BHT ($IC_{50} = 30,8 \pm 0,3$ µg mL⁻¹) e α -tocoferol (IC_{50} de $20,5 \pm 30,2$ µg mL⁻¹). Através do método ABTS foi demonstrada uma excelente atividade anti-radicalar do camazuleno ($IC_{50} = 3,7 \pm 0,7$ µg mL⁻¹) quando comparada ao α -tocoferol ($IC_{50} = 11,5 \pm 1,1$ µg mL⁻¹) e valores entre BHT ($IC_{50} = 6,2 \pm 0,5$ µg mL⁻¹) e ácido ascórbico ($IC_{50} = 1,6 \pm 0,6$ µg mL⁻¹). Frente ao teste do DPPH, não houve atividade atribuível ao camazuleno, provavelmente devido à interferência desta substância com o reagente DPPH (CAPUZZO; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2014). Em contrapartida, Farhoudi, (2013) observou que óleo essencial de camomila demonstrou um aumento dose-dependente no efeito anti-radicalar, apresentando 78 % de inibição em uma concentração de 350 µg mL⁻¹. Esse valor foi considerado semelhante ao do BHT (89 %) na mesma concentração. Através do poder redutor do ferro, foi observado que a camomila apresentou um valor de EC_{50} ($26,7$ µg mL⁻¹) ligeiramente inferior ao BHT ($EC_{50} = 19,5$ µg mL⁻¹).

A correlação da capacidade anti-radicalar e redutora de 13 óleos essenciais e extratos metanólicos das flores da camomila foi avaliada, respectivamente, através dos testes DPPH e FRAP, sendo os resultados destes dois testes expressos como equivalentes

a Trolox (ET) ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ planta seca). Verificou-se que os 13 extratos metanólicos no teste DPPH demonstraram uma atividade mais pronunciada, quando comparados aos 13 óleos testados. O melhor valor obtido para extrato foi de $881,4 \pm 1\ \mu\text{mol ET}/100\text{ mg}$, enquanto o melhor valor obtido para óleo foi de $273,5 \pm 4\ \mu\text{mol ET}/100\text{ mg}$. Na avaliação da capacidade anti-radicalar através do teste FRAP, se observou que alguns óleos não apresentaram atividade e que alguns tiveram valores semelhantes aos extratos. O melhor valor obtido para óleo foi de $657,1 \pm 5\ \mu\text{mol ET}/100\text{ mg}$ e o melhor valor obtido para extrato foi de $1200,3 \pm 10\ \mu\text{mol ET}/100\text{ mg}$. Se pode observar que entre os óleos essenciais os melhores resultados no teste FRAP foi nos óleos ricos em substâncias oxigenadas, particularmente bisabolois e camazuleno.

1.1.3 Potencial em alimentos

Apesar de ser conhecida majoritariamente pelo seu uso medicinal, a camomila possui grande importância no setor alimentício, tendo seu uso como chá altamente difundido (PARDO-DE-SANTAYANA; MORALES, 2010; DAS, 2014; PIERONI et al., 2017). O consumo mundial é de aproximadamente 1 milhão de copos por dia (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010), sendo usada principalmente devido ao seu potencial antioxidante relacionado as substâncias fenólicas presentes na espécie (RAAL et al., 2012a; GUIMARÃES et al., 2013; KOGIANNOU et al., 2013; FOTAKIS et al., 2016) Na Europa é utilizada como erva aromática para cozinhar e realçar o sabor de alimentos (RAVINDRAN; DIVAKARAN; PILLAI, 2012).

Além do uso tradicional como infuso, diversos trabalhos têm demonstrado a potencialidade desta espécie no campo alimentício. O enriquecimento de queijo cottage com extrato obtido por decocção demonstrou potencial, pois melhorou propriedades antioxidantes do alimento sem modificar as propriedades nutricionais. Além disso, melhorou a conservação do queijo enriquecido com o extrato, quando comparado com o controle sem adição do extrato (CALEJA et al., 2015).

A incorporação do óleo essencial desta espécie em filmes de caseína demonstrou um potencial antibacteriano frente as bactérias *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo a aplicação deste em embalagens alimentares para a prevenção de crescimento de bactérias deterioradoras de alimentos (ALIHEIDARI et al., 2013). A adição do óleo essencial da espécie em iogurte demonstrou trazer benefícios sensoriais, com a melhora de diversas características deste alimento como: cor, aparência, sabor, textura, sinérese,

odor, acidez e aceitabilidade geral, além de diminuir o crescimento de microrganismos deterioradores de iogurte (YANGILAR; YILDIZ, 2018).

1.2 NANO-EMULSÕES

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que abrange uma gama de processos, materiais e aplicações em diversas áreas do conhecimento. Ela visa o melhoramento de algumas propriedades intrínsecas através da manipulação em escala nanométrica da matéria (HANDFORD et al., 2014). Diversos sistemas nanométricos tem sido citados na literatura, como nanodispersões (BITENCOURT et al., 2018; GARCIA; FERNANDES; DA CONCEIÇÃO, 2019), lipossomas (UMAGILIYAGE et al., 2017), nanopartículas poliméricas (ZANETTI et al., 2018), nanopartículas lipídicas sólidas (SHTAY et al., 2019) e nano-emulsões (ARTIGA-ARTIGAS; LANJARI-PÉREZ; MARTÍN-BELLOSO, 2018; KWAN; DAVIDOV-PARDO, 2018; NIRMAL et al., 2018; SEDAGHAT DOOST et al., 2018; SHU et al., 2018).

Estas últimas têm ganhado destaque devido as suas propriedades físicas induzidas pelo pequeno tamanho de gotícula e grande área interfacial (SOLANS; SOLÉ, 2012), como alta estabilidade cinética e transparência óptica quando comparadas as emulsões (SOLANS et al., 2005). As nano-emulsões do tipo óleo em água apresentam como uma vantagem a possibilidade de incorporação de ativos lipofílicos, como óleos essenciais, vitaminas lipofílicas, entre outros, em matrizes aquosas.

Neste trabalho se usará o termo nano-emulsão ao invés de nanoemulsão para enfatizar a natureza deste tipo de sistema, ou seja, uma emulsão com gotículas em escala nanométrica e também para diferencia-la de microemulsões, que apesar de possuírem esse termo não são emulsões (SOLANS; SOLÉ, 2012)

A adição desses ativos em matrizes líquidas que utilizam o meio aquoso como veículo, melhoram a estabilidade tanto física quanto química (SAGALOWICZ; LESER, 2010). Desse modo, a nano-emulsificação destas possibilita contornar estes desafios, permitindo uma maior proteção dos mesmos (MOLET-RODRÍGUEZ; SALVIA-TRUJILLO; MARTÍN-BELLOSO, 2018). Esta é uma vantagem adicional à estabilidade cinética pronunciada das nano-emulsões, notadamente maior quando comparada as emulsões tradicionais.

As nano-emulsões são um tipo de emulsões, classicamente conceituadas como a dispersão de um líquido imiscível em outro na forma de gotículas em escala nanométrica (MCCLEMENTS, 1999), estabilizadas com auxílio de um ou mais agentes emulsionantes, normalmente tensoativos (GHOSH; SUGUMAR; CHANDRASEKARAN, 2016). As

emulsões tradicionais, ou macro emulsões, são sistemas termodinamicamente e cineticamente instáveis e que, por possuírem tamanho de gotícula em escala micrométrica/macrométrica, se apresentam como sistemas opticamente opacos. Já as microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, que possuem partículas com tamanho diminuto e possuem boa estabilidade quando comparadas as emulsões convencionais. Visualmente se apresentam como sistemas transparentes, no entanto, para sua fabricação é necessária a utilização de uma grande quantidade de tensoativo, acarretando maiores custos de produção e alteração de sabor (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013). Além disso, grandes quantidades de tensoativos podem causar hemólise e lise celular, inviabilizando o uso deste tipo de emulsão em algumas aplicações (MANAARGADOO-CATIN et al., 2016). Já as nano-emulsões, assim como as emulsões tradicionais, são caracterizadas por serem sistemas termodinamicamente instáveis. Porém, são sistemas cineticamente estáveis, por possuírem maior estabilidade à separação gravitacional e agregação de suas partículas. Essa é a principal diferença quando comparadas as emulsões, devido ao seu tamanho diminuto, sem que haja necessidade de uso de grandes quantidades de tensoativos, como no caso das microemulsões.

São relatadas na literatura diversas faixas de tamanhos para as nano-emulsões, como: 10 a 100 nm (MCCLEMENTS, 2011), 20 a 500 nm (SOLÈ et al., 2006), 20 a 200 nm (SOLANS et al., 2005), 100 a 400 nm (CALLENDER et al., 2017), podendo ter aspecto transparente ou levemente turvo dependendo do tamanho das gotículas (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012).

Apesar das definições clássicas, recentemente novas nano-emulsões têm surgido. Dentre elas, algumas vem sendo preparadas sem o auxílio de tensoativos, sendo compostas por dois líquidos imiscíveis e um solvente miscível ou parcialmente miscível em ambas as fases, chamado de anfi-solvente (HOU; XU, 2016). Estas formulações livres de tensoativos tem chamado a atenção devido a redução do uso de matéria-prima, sendo importante do ponto de vista econômico e ambiental (KNIGHT; CARUANA, 2007; SAKAI, 2008; HOU; XU, 2016).

1.2.1 Métodos de obtenção

As nano-emulsões podem ser obtidas por diversos métodos que basicamente podem ser divididos em duas abordagens. Nos métodos de alto aporte de energia, a energia necessária para a formação de pequenas gotículas é obtida através de uma fonte externa como: homogeneizadores de alta velocidade (ADHAVAN et al., 2017; TIAN et al., 2017)

homogeneizadores de alta-pressão (BENJEMAA et al., 2018), ultra-sonicadores (HASHEMI GAHRUIE et al., 2017) e microfluidizadores (ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017; ARTIGA-ARTIGAS; LANJARI-PÉREZ; MARTÍN-BELLOSO, 2018). Já os métodos de baixo aporte de energia fazem uso das propriedades físico-químicas do sistemas para a formação das gotículas (SANCHEZ-DOMINGUEZ, MARGARITA; RODRIGUEZ-ABREU, 2009; MAALI; MOSAVIAN, 2013). Os métodos de baixo aporte de energia têm chamado a atenção por serem mais baratos, quando comparados aos de alto aporte, principalmente por não necessitarem de equipamentos de alto custo e por permitirem a formação de gotículas com tamanho diminuto usando somente a energia química do sistema (SOLANS; SOLÉ, 2012). Suas principais classificações são mostradas a seguir.

1.2.1.1 Inversão de fases

Esses métodos podem ser classificados a partir da mudança ou não da curvatura espontânea do tensoativo durante o processo de emulsificação (SOLANS; SOLÉ, 2012). Quando há a mudança espontânea da curvatura do tensoativo do negativo para o positivo, ou vice e versa, temos os métodos de inversão de fases. Essa mudança pode se dar através da mudança de temperatura do sistema, chamado de método de temperatura de inversão de fases (PIT – do inglês Phase inversion Temperature) ou da mudança da composição (PIC – do inglês Phase Inversion Composition) (SOLANS; SOLÉ, 2012; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013).

1.2.1.2 Auto nano-emulsificação

A auto nano-emulsificação é um método de obtenção de nanoemulsões que não envolve a mudança da curvatura do tensoativo. As gotículas são obtidas através da diluição da fase continua sem transição de fases. Esta diluição leva a difusão do componente miscível da fase orgânica para a fase aquosa, resultando em aumento dramático da área interfacial e levando a formação de um sistema metaestável (SOLANS; SOLÉ, 2012; SOLÉ et al., 2012).

A obtenção de nanoestruturas em sistemas livres de tensoativos pode ser feita através do gotejamento de água sobre a mistura do solvente anfifílico com a fase oleosa (KAYALI et al., 2016; LUCIA et al., 2017) ou através do gotejamento do solvente anfifílico sobre a

mistura de água com a fase oleosa (LIU et al., 2018). Diversos sistemas nanoestruturados baseados em produtos naturais já foram desenvolvidos.

1.2.2 Estratégias para a obtenção

Na nano-emulsificação tradicional, a escolha do(s) tensoativo(s) correto(s) é essencial na obtenção de um sistema estável (BERNARDI et al., 2011), pois o tensoativo será o agente responsável por criar uma força repulsiva entre as gotículas, reduzindo a tensão interfacial na interface óleo/água e permitindo então a estabilidade (GHOSH; SUGUMAR; CHANDRASEKARAN, 2016). Os tensoativos podem ser definidos como moléculas anfifílicas, que possuem uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica (SINGH et al., 2017). Estes ainda podem ter características específicas de acordo com a natureza de sua cabeça ou cauda. O grupo que compõem a cauda pode ser aniônico, catiônico, zwitteriônicos e não iônico e a cauda geralmente é composta de uma cadeia hidrocarbônica, podendo ser saturada ou insaturada, linear ou ramificada, alifática ou aromática (MCCLEMENTS, 1999).

Um dos métodos para a classificação de tensoativos é o equilíbrio hidrófilo-lipofilo (EHL), que consiste no balanço entre o tamanho e a força dos grupos lipofílicos e hidrofílicos que compõem um tensoativo. A utilização da escala de EHL permite a predição do comportamento de um tensoativo e reduz o tempo envolvido na seleção de agentes emulsificantes. Tensoativos com baixos valores de EHL tem características mais lipofílicas enquanto que tensoativos com valores de EHL maiores possuem características mais hidrofílicas (GRIFFIN, 1949).

Diversos estudos tem mostrado que a escala de EHL é uma ferramenta versátil na escolha do melhor tensoativo para a formação de emulsões, visto que através da determinação do EHL requerido de um óleo se podem obter formulações com menores tamanhos de partícula (WANG et al., 2009). Diante disso percebe-se a importância da escolha de tensoativos para a obtenção de nano-emulsões e a utilização da escala de EHL como ferramenta para a obtenção de formulações estáveis.

De acordo com dados da literatura, a composição das nano-emulsões pode variar e consequentemente suas características físico-químicas. O emprego de um tensoativo é reportado na literatura assim como a associação destes para a produção de nano-emulsões (ZHANG et al., 2017). Em relação ao emprego de um tensoativo, foi possível obter nano-emulsões por baixo aporte de energia contendo óleo essencial de alecrim utilizando polissorbato 20 como tensoativo e obtendo gotículas com tamanho ao redor de 190 nm

(DUARTE et al., 2015). Amrutha; Sundar e Shetty (2017) relataram a fabricação de nano-emulsões com óleos essenciais de cominho e pimenta utilizando-se polissorbato 80 através de método de alto aporte de energia, obtendo tamanho de gotículas entre 30 e 90 nm.

Já em relação a associação de tensoativos, Moghimi; Aliahmadi e Rafati (2017) obtiveram nano-emulsões contendo trans-cinamaldeído e 1,8-cineol com tamanho de gotícula variando entre 30 e 150 nm, através de método de alto aporte de energia e utilizando-se mistura de polissorbato 80 e polissorbato 20. Hilbig et al (2016) utilizaram mistura de polissorbato 80 e alginato láurico para obter sistemas a base do óleo essencial da casca de canela, com tamanho de gotícula entre 100 e 300 nm.

A variação de relação entre tensoativos e óleos é uma estratégia que também é utilizada para a obtenção de nanoemulsões. A obtenção de nanoemulsões contendo vitamina D foi relatada. Foi avaliado uma série de parâmetros na formação das nano-emulsões, sendo a RTO um deles. Foram avaliados as RTOs de 0,5 a 1,75 e se pode e se obteve nanoemulsões com pequeno tamanho de gotícula utilizando polissorbato 80 na RTO 1, ou seja a mesma quantidade de tensoativo e óleo (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; PETSCHENKA; AGRAWAL, 2016).

Em outro trabalho o SOR foi variado de 0,1 a 2,5 para a obtenção de nano-emulsões por baixo aporte de energia. Se pode observar que maiores RTOs levavam a uma diminuição no tamanho de gotícula, sendo que a partir da RTO 0,65 até a última analisada, 2,5, houve uma leve redução no tamanho (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012)

O uso de diagramas ternários para determinação da região onde são formadas nanoestruturas é uma estratégia bastante utilizada nos estudos de obtenção de sistemas livres de tensoativos, utilizando diferentes solventes anfifílicos para a construção destes diagramas. Dois sistemas ternários de limoneno/água/1-propanol e limoneno/água/tert-butanol foram preparados e suas atividades enzimáticas frente a enzima peroxidase foram avaliadas. Foram obtidos agregados em escala nanométrica com potente atividade enzimática (KRICKL et al., 2018).

Misturas ternárias de água/eugenol/etanol foram feitas, variando a proporção de cada componente, possibilitando a obtenção de agregados na escala nanométrica. Se observou que houve formação de uma região de fase pseudo-única e uma região multifásica em que diferentes partições de etanol em eugenol e água foram encontradas (LUCIA et al., 2017).

1.2.3 Nanoestruturas a base de camomila

Em relação a camomila, alguns poucos sistemas nanométricos têm sido citados na literatura. Esmaeili et al., (2011) relataram a obtenção de nanocápsulas contendo o extrato metanólico das partes aéreas de *M. chamomilla*. Foram obtidas nanocápsulas com tamanho médio de partícula entre 186 e 212 nm, sendo as nanoestruturas em formato de esfera confirmadas por microscopia eletrônica de varredura. Dogru et al., (2017) utilizaram o extrato aquoso dos capítulos florais de *M. chamomilla* para a biossíntese de nanopartículas de prata. As nanopartículas obtidas apresentaram formato esférico, com tamanho variando entre 37 e 70 nm. Neste estudo também foi avaliado o potencial antimicrobiano das nanopartículas obtidas, demonstrando que estas foram mais efetivas contra os microrganismos testados que o extrato de sozinho.

Nanopartículas de cobre foram obtidas utilizando o extrato aquoso das flores de camomila. Foram obtidas nanoestruturas com formato esférico e distribuição monomodal, com tamanho de 140 nm. Foi demonstrado que estas possuem potencial antioxidante (DUMAN; OCSOY; OZTURK, 2016).

Uma nano-emulsão contendo o óleo essencial de camomila foi obtida através de um método de gotejamento de água, utilizando como fase oleosa o migliol com óleo essencial a 2.5%, polissorbato 80 como tensoativo e etanol como co-tensoativo. Entretanto, este trabalho não relata nenhum dado referente à caracterização física da nanoformulação obtida (NAZ et al., 2015)

2.1 GERAL

Obter e caracterizar nano-emulsões contendo o óleo essencial de *Matricaria chamomilla* L. através de técnicas de auto-nanoestruturação e baixo aporte de energia.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Extrair e analisar os componentes do óleo essencial de *M. chamomilla* (OEC) por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas;
- b) Avaliar a influência das propriedades físico-químicas *in silico* do OEC na nano-emulsificação;
- c) Avaliar a auto nano-nanoemulsificação do OEC;
- d) Preparar nano-emulsões contendo o OEC utilizando tensoativos não iônicos;
- e) Caracterizar as nano-emulsões quanto a distribuição do tamanho de gotícula;
- f) Selecionar a nano-emulsão contendo o OEC mais promissora, avaliar sua estabilidade física e química da nano-emulsão contendo o OEC mais promissora e determinar a atividade antibacteriana.

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A droga vegetal, constituída por capítulos florais estabilizados de *M. chamomilla* (Figura 5) foram obtidos comercialmente do fornecedor Nativa Produtos alimentícios Ltda. (Senador Canedo – Goiás).

Figura 5 - Capítulos florais de *M. chamomilla*.



Fonte: Autoria própria.

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. chamomilla* (OEC)

O OEC foi obtido por hidrodestilação dos capítulos florais, utilizando-se aparato do tipo Clevenger por 3 horas. Após a extração, o OEC foi filtrado em sulfato de sódio anidro e armazenado ao abrigo da luz e sob refrigeração (4°C).

3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO OEC

3.3.1 Auto nano-emulsificação

A caracterização química do OEC utilizado para a etapa de auto nano-emulsificação foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de espectrômetro de massas utilizando-se um cromatógrafo QP2010 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) com espectrômetro de ionização eletrônica. Uma alíquota (1 µL) do OEC foi dissolvido em diclorometano e foi injetado em uma coluna RTX-5 (d.i.= 0.25 mm, comprimento: 30 m,

espessura: 0.25 μm). As condições operacionais foram: temperatura do forno, 60-290°C sob uma taxa 3°C/min; temperatura do injetor 260°C; modo de injeção: split; gás de arraste, He; fluxo 1 mL/min; espectrômetro de massas: impacto de elétron (EI), potencial de ionização, 70 eV, temperatura da fonte de íons, 250°C, e faixa de massa 40- 300 amu. Os índices de retenção (IR) foram calculados por interpolação com os tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₉-C₃₀) analisados nas mesmas condições (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963). A identificação das substâncias foi realizada por comparação de seus índices de retenção e espectros de massa com os relatados na literatura (ADAMS, 2007). O padrão de fragmentação dos compostos também foi verificado na biblioteca de espectro de massas do NIST (National Institute of Standards and Technology).

3.3.2 Nano-emulsões contendo tensoativos

A análise qualitativa e quantitativa do óleo essencial utilizado nas etapas de preparação das nano-emulsões com tensoativos foi realizada utilizando-se um cromatógrafo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Uma alíquota (1 μl) do óleo essencial foi injetado em uma coluna Rxi-5ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura. As condições operacionais foram: temperatura do injetor: 250 °C, gás de arraste He (99,995%), temperatura do forno 60-240°C, com taxa de 3°C/min, fluxo de 1ml/min, Split 1:20. O espectrômetro de massas operou no modo de impacto de elétrons, com potencial de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de íons de 200 °C, linha de transferência a 250 °C. Os espectros de massa foram adquiridos usando varredura automática de 0.3 segundos e os fragmentos de massa foram gravados na faixa de 35-400 m/z. Os índices de retenção (IR) foram calculados por interpolação com os tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₈-C₂₀) analisados nas mesmas condições (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963). A identificação das substâncias foi realizada a partir da comparação dos seus índices de retenção e espectros de massa com as livrarias NIST 2011; ADAMS 2007 e FFNSC 2.

3.4 PROPRIEDADES MOLECULARES E FÍSICO-QUÍMICOS *in silico*

Os parâmetros moleculares e físico-químicos das substâncias presentes no OEC foram gerados da plataforma Percepta ACD/Labs (Modulo PhysChem) ou da US

Environmental Protection Agency's EPISuite™. Todas as propriedades foram coletas usando o software ChemSpider. Os seguintes critérios foram utilizados: alto logP ($> 4,3$), alta polarizabilidade ($> 21 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$), alto volume molar ($> 192 \text{ cm}^3/\text{mol}$), baixa solubilidade em água ($< 0,05 \text{ mg/L}$), alta solubilidade em água ($> 5 \text{ mg/L}$) (RAO; MCCLEMENTS, 2012a).

3.5 OBTENÇÃO DAS NANO-EMULSÕES

3.5.1 Auto nano-emulsificação

O método de auto-nanoemulsificação foi feito de acordo com Maksimenko et al. (2013), com algumas modificações. A solução estoque do óleo essencial foi preparada em metanol na concentração de 4 mg/mL . A fase orgânica (1 mL da solução estoque) foi adicionada gota a gota sobre água deionizada sob agitação constante em um agitador do tipo vórtex. Em seguida, foi adicionada uma quantidade adicional (3 g) de água deionizada para facilitar a difusão do solvente orgânico para a fase externa e o sistema foi adicionado por dois minutos adicionais. Em seguida, o sistema foi evaporado sob pressão reduzida por 20 minutos para remoção do solvente e a nano-emulsão foi armazenada em frascos do tipo vial. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.5.2 Nano-emulsificação com tensoativos não iônicos

As formulações foram preparadas para uma massa final de 4 g , contendo $0,5\%$ (m/m) de OEC e variando a relação tensoativo/óleo (item 3.5.4) e água destilada (q.s.p. 4 g). Primeiramente o (s) tensoativo (s) e o OEC foram vigorosamente misturados e em seguida, água deionizada foi adicionada gota a gota.

3.5.2.1 Avaliação da formação e estabilização de nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais

Uma serie de formulações utilizando-se tensoativos não iônicos derivados do polissorbato (Polissorbatos 20, 80, 81 e 85) foram preparadas.

3.5.2.2 Avaliação da formação e estabilização de nano-emulsões utilizando pares de tensoativos não iônicos

Uma série de formulações utilizando-se misturas de tensoativos não iônicos hidrofílicos (polissorbato 20 ou polissorbato 80) selecionados na etapa anterior e lipofílicos (monooleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano) foram preparadas em uma ampla faixa de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). O EHL resultante de cada mistura de tensoativos foi calculado de acordo com a de acordo com a equação: $EHL_m = (EHL_a \times \%A + EHL_b \times \%B) / 100$

3.5.4 Avaliação da influência da relação tensoativo/óleo na formação e estabilização de nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos

O cálculo da RTO foi realizado de acordo como descrito por (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016) através da formula: $RTO = m_s / m_o$, m_s é a massa do tensoativo e m_o é a massa do OEC, sendo aplicado tanto para as nano-emulsões preparadas com tensoativos individuais quanto para as preparadas com pares de tensoativos. Foram preparadas nano-emulsões com igual quantidade e o dobro de tensoativo (s).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES

3.6.1 Aparência visual

As formulações obtidas foram armazenadas em frascos do tipo vial de vidro, com volume sempre constante e avaliadas quanto ao aspecto visual (cremagem, sedimentação, separação de fases, entre outros aspectos).

3.6.2 Distribuição de tamanho de gotícula

O diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão (IPd) foram obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL) utilizando-se equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern, UK) equipado com laser vermelho de 10 mW ($\lambda = 632.8$ nm). As medidas foram feitas em um ângulo de espalhamento de 173° . O tamanho foi expresso em função do raio hidrodinâmico (R_H) de uma esfera hipoteticamente dispersa, obtido de acordo com a equação de Stokes-Einstein: $D_t = k_B T / (6\pi\eta R_H)$, onde D_t é o coeficiente de difusão translacional, k_B é a constante de Boltzmann ($1.38064852 \times 10^{-23}$ J/K), T é a temperatura, η é a viscosidade absoluta e R_H é o raio hidrodinâmico. Os resultados relacionados ao tamanho foram expressos em termos das medidas de intensidade. Os valores de IPd na

faixa de 0,1-0,4 foram considerados moderadamente polidispersos enquanto que valores abaixo ou acima dessa faixa foram considerados, respectivamente, altamente monodispersos ou altamente polidispersos (BHATTACHARJEE, 2016). As nano-emulsões foram diluídas em água deionizada e as análises foram realizadas em triplicatas.

As variações de tamanho de gotícula . (GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015; MEHMOOD, 2015) foram expressas em função da equação a seguir: $VT_{x,y} = 100 \times [\text{media do tamanho } (d_y) - \text{media do tamanho } (d_x)] / \text{media do tamanho } (d_x)$, onde $VT_{x,y}$ é a variação de tamanho após Y dias de armazenamento, quando comparado ao tamanho após X dias de armazenamento. $X = 0$ para o diâmetro observado no dia da preparação. Valores positivos indicam incremento de gotícula (IG) e valores negativos indicam redução de gotícula (RG).

3.7 ESTABILIDADE

A nano-emulsão com melhores características frente aos parâmetros avaliados foi escolhida como nano-emulsão otimizada e utilizada para estudos estabilidade.

3.7.1 Física/térmica

A avaliação do incremento gradual da temperatura foi realizada utilizando-se uma rampa linear de temperatura, iniciando em 25°C até 80°C, com intervalos de 5°C. A influência de ciclos de refrigeração/restabelecimento de temperatura ambiente também foi realizada, através da redução da temperatura de 25 ° para 4°C (um ciclo) e aquecimento para 25°C. Um total de quatro ciclos foram investigados.

3.8 RELAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS (RMS)

As condições cromatográficas previamente descritas no item 3.3.2 foram utilizadas para análise das substâncias do óleo essencial após preparação da nano-emulsão otimizada. Foi determinada a RMS conforme a seguir: $\text{Óxidos de bisabolol} / A_{\text{sesq2}}$, onde $\text{Óxidos de bisabolol}$ é a soma das áreas dos (óxidos de bisabolol) e A_{sesq2} é a área do α -bisabolol ou camazuleno. A RMS foi calculada utilizando-se dados de análise realizada no dia da preparação e após 1 e 7 dias de armazenamento. Uma alíquota de 500 μl da nano-emulsão foi adicionada em um funil de separação juntamente com 1500 μl de hexano. Essa mistura foi agitada por 2 minutos e deixada em repouso ate a completa separação de fases. A

fração hexânica foi coletada e o procedimento repetido 3 vezes. O pool de frações hexânicas foi utilizado para a análise cromatográfica.

3.9 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

3.9.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão das bactérias gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 8739) que foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ). Estas foram mantidas em solução de glicerol em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Bromatologia e Controle de qualidade (UNIFAP). Para o teste as bactérias foram ressuspensas em caldo nutriente e mantidas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para sua ativação e posteriormente semeadas em placas de petri contendo o meio ágar sal manitol, para a bactéria *S. aureus*, e Agar MacConkey para *E. coli*, e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 para induzir o crescimento exponencial destes.

3.9.2 Preparo do inoculo

O inoculo foi preparado através da suspensão das cepas em fase exponencial em caldo Mueller-Hinton (marca). Foram coletadas 3-4 colônias bacterianas, ressuspensas no caldo e a turbidez do inoculo foi ajustada para 0.5 na escala de McFarland (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL) através da diluição das culturas e então diluídas para 1×10^3 UFC/mL (CLSI, 2012).

3.9.3 Determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida

Os ensaios de CMI e CMB foram feitos através do método de microdiluição em caldo Muller-Hinton como descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI, 2012). O óleo essencial de *M. chamomilla* foi diluído em uma solução de dimetilsulfoxido (DMSO) na concentração inicial de 4000 µg/ml e a nano-emulsão possuía uma concentração inicial na mesma concentração do óleo.

Para o teste de microdiluição 100 µL do inoculo contendo 5×10^8 UFC/mL foi adicionado em cada poço juntamente com 100 µL da diluição seriada a partir da

concentração inicial de 4000 µg/ml do óleo essencial e da nano-emulsão, cada diluição foi testada em triplicata. Foi utilizado como controle positivo o clorafenicol (50 µg/ml) para a bactéria gram-positiva e gentamicina (10 µg/ml para a bactéria gram-negativa e solução de tensoativo também foi testada. Após 24 horas de incubação a 37°C em estufa 30 µL de resazurina 0,01% foi adicionada em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37°C durante 3 horas. Após, a leitura visual da placa foi realizada para a determinação da CMI, considerando-se a manutenção da coloração azulada como ausência de crescimento bacteriano enquanto que a mudança para a coloração rosa indicava a reação química de oxido-redução da resazurina em resofurina, sendo interpretada como presença de microrganismo viáveis (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007) . A CMI foi determinada como a concentração mais baixa onde se pode observar mudança de coloração.

A CMB foi determinada através da retirada de uma alíquota de 10 µL do caldo de cada poço em que houve mudança de coloração após a determinação do CIM e semeadura desta em placas contendo ágar muller-Hinton a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média. Para comparação dos dados aplicou-se análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*), seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0.05$) utilizando o software GraphPad Prism® (versão 7.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por cromatografia em fase gasosa permitiu a identificação das seguintes substâncias no OEC utilizado na etapa de auto nano-emulsificação, conforme a seguir: um sesquiterpeno acíclico (E)- β -farneseno, três sesquiterpenos cíclicos derivados do bisabolol ou óxido de bisabolol e o camazuleno, um sesquiterpeno cíclico associado à cor azul do OEC. As cinco substâncias identificados e seus tempos de retenção e índices aritméticos estão mostrados na Tabela 1. Os óxidos de alfa-bisabolol e bisabolol são as principais substâncias do óleo de camomila e úteis para sua classificação. O camazuleno é um sesquiterpeno típico do óleo de camomila e o (E)- β -farneseno também pode ser encontrado em quantidades relativas (BRASIL, 2017).

Enquanto o camazuleno é um artefato da extração e originado a partir do precursor matricina, o (E)- β -farneseno é formado no início da biossíntese sesquiterpênica do principal precursor de compostos acíclicos e cíclicos desta classe, o chamado farnesil pirofosfato (DEWICK, 2002). Esse óleo foi utilizado para preparação de um sistema auto nano-emulsificante livre de tensoativos, com o intuito de se correlacionar as propriedades *in silico* moleculares/físico-químicas na geração e estabilização das nanoestruturas.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de camomila utilizado na auto nano-emulsificação

Substâncias	TR (min)	IA _{calc}	IA _{lit}
(E)- β -Farneseno	34,840	1460	1456
Oxido de α -Bisabolol B	42,677	1660	1658
α -bisabolol	43,687	1687	1685
Camazuleno	45,313	1733	1731
Oxido de α -Bisabolol A	45,958	1751	1749

TR – tempo de retenção expresso em minutos

As diferenças estruturais do bisabolol, derivados do óxido de bisabolol, camazuleno e farneseno podem contribuir decisivamente para a auto nano-emulsificação do OEC. Algumas propriedades moleculares e físico-químicas desses sesquiterpenos são mostradas na Tabela 2. O menor valor de logP foi observado para o óxido de bisabolol, que

possui a maior solubilidade em água. Por outro lado, o maior valor de logP e a menor solubilidade em água foram observados para o farneseno, que também apresentou a menor tensão superficial. Apenas o óxido de bisabolol foi considerado como apresentando alta solubilidade em água, enquanto o segundo mais hidrofílico (alfa-bisabolol) e o segundo mais hidrofóbico (camazuleno) foram considerados com solubilidade intermediária. Um estudo prévio realizado com nano-emulsões contendo óleo essencial de limão mostrou que o limoneno pode não se difundir facilmente de gotículas oleosas para a fase aquosa, uma vez que tem uma solubilidade em água de aproximadamente de 5 mg/L (RAO; MCCLEMENTS, 2012b). Portanto, ambas substâncias poderiam contribuir para a estabilização do sistema. Além disso, o farneseno tem uma menor solubilidade em água, quando comparado com as outras substâncias que compõem o OEC, sendo em torno de 9,022 e-03 mg/L (LogP = 6,62). A solubilidade em água do esqualano é de 2,042 e-010 mg/L e o seu valor de logP é de 15,59. Este é um triterpeno acíclico que é reconhecido como um inibidor da maturação de Ostwald (TADROS et al., 2004). O farneseno tem três unidades de isopreno a menos que o esqualeno, onde o primeiro é um precursor dos sesquiterpenos e o último é um precursor dos triterpenos. Considerando que o segundo não é um constituinte comum dos óleos essenciais, podendo ser adicionado como um aditivo para melhor estabilização das nanoemulsões, é de se esperar que a ocorrência natural do farneseno em óleos essenciais possa desempenhar um papel essencial na estabilização da nano-emulsão, utilizando um conceito mais verde, já que o próprio constituinte estabilizaria o sistema sem necessidade de outros aditivos.

Tabela 2. Propriedades moleculares e físico-químicas *in silico* do óleo essencial de camomila utilizado na auto nano-estruturação

Substância	LogP	Polarizabilidade (cm ³)	Tensão superficial (dyne/cm)	Volume molar (cm ³)	Solubilidade em água (mg/L)
Camazuleno	5,36	25,1±0,5 10 ⁻²⁴	36,1±3.0	188,9±3,0	0,2945
α-bisabolol	5,07	27,8±0,5 10 ⁻²⁴	33,7±3.0	240,9±3,0	1,688
Óxidos de Bisabolol	3,88	27,8±0,5 10 ⁻²⁴	33,0±3.0	242,7±3,0	21,49
Farneseno	6,62	28,0±0,5 10 ⁻²⁴	25,8±3.0	253,0±3,0	0,009022
Esqualeno	15,59	55,8±0,5 10 ⁻²	28,0±3.0	526,0±3,0	2,04E-10
Metanol	-0,72	3,3±0,5 10 ⁻²⁴	18,9±3.0	42,5±3,0	1,00E+06
Etanol	-0,19	5,1±0,5 10 ⁻²⁴	18,9±3.0	59,1±3,0	7,92E+05

Os valores médios de polarizabilidade estavam na faixa de 25,1 (camazuleno) a 28,0 (farneseno), enquanto os valores médios do volume molar estavam na faixa de 188,9 (camazuleno) a 253,0 (farneseno). As propriedades moleculares e físico-químicas de óleos essenciais, principalmente constituídos por monoterpenos, foram previamente associadas ao comportamento de nano-emulsões (RAO; MCCLEMENTS, 2012a, 2012b). O aumento na concentração de substâncias com baixa solubilidade em água pode estar associado a estabilização cinética (ou até mesmo termodinâmica) frente ao incremento de gotículas de uma nano-emulsão preparada com óleo de limão. Esta hipótese foi feita considerando que eles estavam em concentrações suficientemente altas e o efeito da composição é a força motriz termodinâmica que se opõe ao crescimento de gotículas via maturação (RAO; MCCLEMENTS, 2012a).

Também foi levantada a hipótese de que as substâncias presentes no óleo de limão poderiam se localizar entre as caudas não polares das moléculas de tensoativo, em vez de estarem localizados apenas como um núcleo separado no interior da gotícula (RAO; MCCLEMENTS, 2012b).

Os resultados que serão apresentados a seguir sugerem que o OEC foi nano-emulsificado com sucesso, estando de acordo com alguns achados e hipóteses quanto às propriedades moleculares e físico-químicas que correlacionam as características das

substâncias presentes em óleos essenciais com o comportamento das nano-emulsões. Apesar do etanol em si não se auto-estruturar (TURINA et al., 2006), ele é utilizado como co-tensoativo na preparação de nano-emulsões (SHEN; WANG; ZHANG, 2011). Neste contexto, o metanol foi escolhido como solvente orgânico para a avaliação da viabilidade de gerar a nano-emulsão por autoestruturação dos constituintes do OEC. Ele pode migrar facilmente para a fase aquosa e ser facilmente removido na etapa de evaporação, sendo útil para os objetivos desse trabalho.

A tabela 3 mostra o tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersão das diferentes réplicas das nano-emulsões, juntamente com a variação de tamanho. Apesar da sobreposição geral dos gráficos de distribuição de gotículas (Figura 8) mostrar o aumento do desvio padrão, que corresponde a cerca de 13% do valor médio, é importante destacar que os picos mais abundantes nas réplicas estão na faixa entre os valores médios de 226,7 - 334,1 nm conforme a seguir: réplicas I (100%), II ($94,8 \pm 4,5$ nm,%) e III ($97,0 \pm 1,2$ nm,%). Um aumento geral do tamanho das gotículas foi observado em todas as réplicas, evidenciadas por um incremento de gotículas no intervalo de 12 a 32% para as réplicas. Um incremento de gotícula de 21,46% foi observado quando o cálculo envolveu o tamanho médio das gotas do gráfico sobreposto de todas as réplicas. No entanto, o valor médio de gotículas por si só não é um parâmetro conclusivo para afirmar que há incremento de gotículas, caso a distribuição de tamanho não estiver relacionada a um pico com base estreita e/ou monomodal. Em todos os casos, o incremento de gotícula foi acompanhado por um aumento no índice de polidispersão, que foi considerado moderadamente polidisperso apenas no dia 0. Portanto, foi observada uma tendência, em todas as réplicas, para uma distribuição mais polimodal após 1 dia de armazenamento. No entanto, essa variação em relação ao diâmetro do tamanho pode não refletir uma diferença significativa, uma vez que a técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL) só distingue os picos quando sua proporção é de pelo menos 1:3 (BHATTACHARJEE, 2016).

Tabela 3. Tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPd) e variação do tamanho (VT) de gotículas das formulações obtidas por método de auto nano-emulsificação.

Réplica	Dia 0		Dia 1		VT (%)
	Tamanho (nm)	IPd	Tamanho (nm)	IPd	
N1 (I)	185,3 ± 2,563	0,178 ± 0,026	227,7 ± 4,486	0,324 ± 0,032	22.88
N1 (II)	238,8 ± 2,722	0,359 ± 0,008	268,8 ± 12,97	0,443 ± 0,065	12.56
N1 (III)	182,6 ± 4,321	0,403 ± 0,042	240,4 ± 34,36	0,538 ± 0,105	31.65
Media ± DP	202,2 ± 27,60	0,313 ± 0,107	245,6 ± 25,95	0,435 ± 0,113	21.46

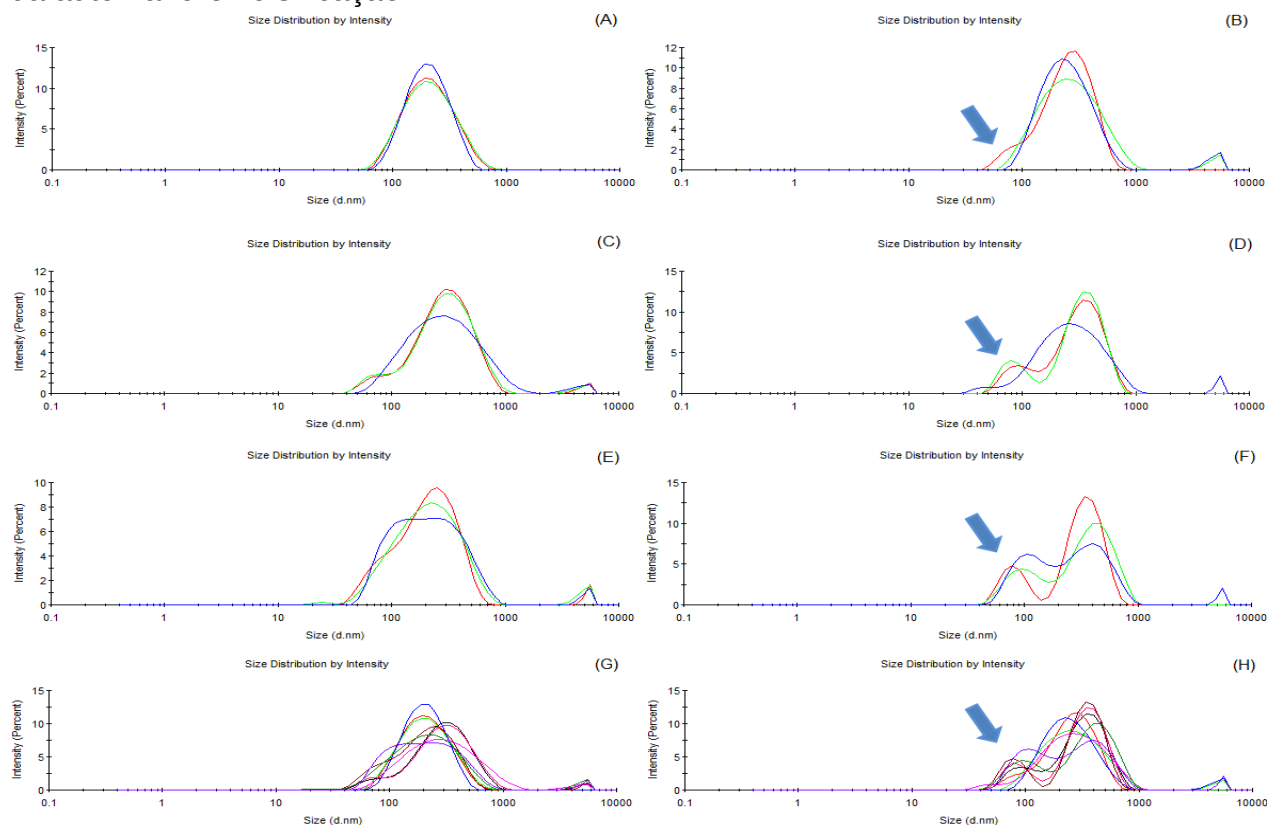
A análise dos gráficos de distribuição de tamanho obtidos no dia da preparação das nano-emulsões (Dia 0) refletem o maior IPd das réplicas II e III. Eles possuem uma base da curva larga, com a maioria das gotículas em torno de 334,1 e 235,2 nm. Há também algumas gotículas maiores (> 4000 nm) que podem ser observadas, correspondendo a menos de 5% da população de gotículas. Por outro lado, uma distribuição mais monomodal é observada na réplica I, que possui 100% de gotículas em torno de 200 nm. Pequenas diferenças entre as réplicas podem ser devido à rápida difusão de substâncias mais hidrofílicas no período entre a preparação e a análise das réplicas II e III. Este comportamento foi anteriormente descrito para nano-emulsões baseadas em óleos essenciais, mesmo em sistemas contendo tensoativos (RAO; MCCLEMENTS, 2012a).

A análise após 1 dia de armazenamento mostra que a abundância de gotículas com tamanhos maiores observadas nas réplicas II e III permanecem em porcentagens próximas, quando comparadas ao dia 0. Provavelmente, o crescimento das gotículas ocorreu no dia 0, sendo que as substâncias alcançaram um equilíbrio entre a fase interna e externa antes do dia 1 e, portanto, evitando a disponibilidade de substâncias para a migração e aumento da maturação de Ostwald. Uma ampla distribuição de tamanho de gotícula (valor médio em torno de 170 nm) foi observada após a análise por EDL de nano-emulsões à base de óleo de limão e este resultado foi atribuído a uma alta concentração de gotículas de emulsão não dissolvidas. No entanto, considerou-se que, mesmo em uma distribuição de tamanho mais ampla, a maturação de Ostwald ocorreria em menor proporção, quando comparado a substâncias solúveis em água pura (RAO; MCCLEMENTS, 2012b). No caso da réplica I, as gotículas maiores apareceram após 1 dia, sendo em percentual semelhante ao observado para as réplicas II e III. A ausência destas gotículas maiores no dia 0 pode ser explicada pela questão acima mencionada, relacionada ao tempo despendido entre a preparação e a análise das nano-emulsões.

Os gráficos individuais de distribuição de gotículas de todas as réplicas após 1 dia de armazenamento (Dia 1) mostram uma tendência para a detecção de picos com um

tamanho inferior a 100 nm (seta azul) (Figura 6). Esta observação pode ser notavelmente observada especialmente nas réplicas II e II, em que picos ≤ 100 nm representam uma porcentagem considerável (cerca de 20-30%) da distribuição total de gotículas. Este perfil pode não ser consideravelmente diferente da distribuição de tamanho observada no dia 0, sendo provavelmente um gráfico de melhor resolução. Neste caso, a distribuição inicial mais ampla observada nos gráficos anteriores pode ser devido à sobreposição de dois conjuntos de populações de gotículas. A modificação na fase externa, com tendência à formação de uma solução aquosa saturada de substâncias do óleo essencial mais solúveis, pode afetar a análise. Essa hipótese pode ser considerada, uma vez que está bem estabelecido que o meio externo pode modificar a resolução dos gráficos de EDL (BHATTACHARJEE, 2016).

Figura 6 - Gráficos de distribuição do tamanho de gotícula dos sistemas obtidos por meio da auto nano-emulsificação.



Silva et al., (2011) sugeriram que a difusão do solvente residual obtido durante a preparação de nanodispersões pode levar à redução de gotículas. Portanto, pode-se esperar que a liberação de substâncias mais hidrofílicas do óleo essencial que constitui a fase interna da nano-emulsão possa atuar por um mecanismo similar, reduzindo o tamanho das gotículas. De fato, após o armazenamento foi possível observar claramente uma

população de gotículas com menor tamanho e essa redução pode estar associada à explicação supracitada. Considerando que não foi observado maior aumento na abundância de gotículas maiores após 1 dia de armazenamento, a maturação de Ostwald pode não ter ocorrido entre o dia 0 e o dia 1. Esse comportamento inesperado, no qual os compostos liberados não migram para gotículas maiores, pode ser explicado por um mecanismo adicional, conhecido como “*compositional ripening*” (do inglês), onde a migração inicial de substâncias mais hidrofílicas leva ao aumento na concentração de substâncias mais lipofílicas nas gotículas de menor diâmetro, inibindo a maturação de Ostwald. Seria de se esperar que até mesmo os “compostos mais hidrofílicos” de um óleo essencial sejam voláteis. Portanto, eles podem ser divididos entre a fase aquosa externa (quando liberada por gotículas pequenas ou grandes) para *headspace* do frasco no qual elas estão armazenadas. Experimentos adicionais relativos à investigação da partição desses sesquiterpenos entre a água e o *headspace*, juntamente com o monitoramento dos gráficos de distribuição de tamanho das gotículas, são necessários para corroborar essa hipótese ainda não descrita na literatura. Assim, considerando que a maioria dos estudos que correlacionam as propriedades moleculares e físico-químicas em nano-emulsões estão relacionados a monoterpenos (RAO; MCCLEMENTS, 2012a, 2012b).

Apesar do crescente interesse na preparação de nano-emulsões com óleos essenciais, poucas informações podem ser encontradas sobre a auto nano-emulsificação dessas matérias-primas naturais. Alguns monoterpenos, como cineol, timol, geraniol, mentol e cânfora, tiveram sua concentração micelar crítica (CMC) determinada, demonstrando a capacidade desses compostos em se autoestruturarem. No entanto, o tipo de sistema auto-estruturado depende de vários aspectos. Devido a restrições termodinâmicas e/ou geométricas e considerando que alguns terpenos não possuem anéis planares e/ou não são claramente estruturas anfipáticas, pode ser difícil determinar se micelas ou outro tipo de estruturas são formados (TURINA et al., 2006).

A conjugação de compostos isoprenoides com fármacos, permitindo assim a obtenção de compostos anfifílicos que se auto-estruturaram já foram reportados. Conjugados preparados com unidades esqualenoila induziram a formação de nanoestruturas em torno de 100-300 nm (COUVREUR et al., 2006) e investigações adicionais com conjugados preparados com acetato de farnesil, geranilacetil e outro composto de poliisoprenol permitiram a formação de nanoestruturas com tamanho em torno de 112 - 270 nm, o que está de acordo com a faixa nano observada no estudo anterior do mesmo grupo. Apesar de alguns de ácidos poliisoprênicos auto-estruturados também terem

sido preparadas para o controle dos ensaios farmacológicos, sua caracterização por DLS não foi observada (MAKSIMENKO et al., 2013).

Devido ao fato de que sesquiterpenos ou os óleos essenciais contendo sesquiterpenos não são bem estudados em relação aos sistemas livres de tensoativos, os achados descritos nesse trabalho são de suma importância, embora investigações adicionais devem ser estimuladas. Após a confirmação da possibilidade de auto-nanoemulsificação do OEC, uma quantidade adicional foi obtida para preparação da nano-emulsões com tensoativos não-iônicos. A hidrodestilação das partes aéreas permitiu a novamente obtenção do OEC característico da espécie. O rendimento de extração foi de 0,07% (p/p) e a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas permitiu a identificação de 41 substâncias (**tabela 4**). A maioria foram sesquiterpenos oxigenados, além de alguns sesquiterpenos hidrogenados. As substâncias majoritárias no OEC foram o óxido de α - bisabolol B (19,3%), β -farneseno (19,6%), α -bisabolol (11,6%), óxido de α - bisabolol A (11,1%), Z-spiroeter (7,7%) e espatulenol (4.6%). O camazuleno, sesquiterpeno responsável pela coloração azul característica do OEC, também foi identificado e correspondeu a 1,9% da abundância relativa. Dois tipos de OEC podem ser encontrados, o óleo rico em óxidos de bisabolol (29-81%) e o óleo rico em α -bisabolol (10-65%) (BRASIL, 2017). Portanto, pode-se sugerir que o OEC utilizado no presente estudo pertence ao tipo rico em óxidos de bisabolol.

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de camomila utilizado na preparação de nano-emulsões com tensoativos não iônicos.

IR (C)	IR (L)	Substância	%
985	981	6-metil-5-Hepten-2-ona	0,18
999	999	Álcool Yomogi	0,11
1372	1364	Acido Decanoico	1,14
1386	1387	α -Isocomeno	0,12
1458	1454	(E)- β -Farneseno	19,56
1460	1464	9-epi-(E)-Cariofileno	0,1
1469	1466 F	Sesquicineol	2,26
1481	1478	δ -Murolene	0,87

1486	1489	β -Selineno	0,42
1494		NI	0,1
1496	1500	Biciclogermacreno	0,3
1499	1505	α -Cupreneno	0,32
1507	1504	E,E- α -Farneseno	0,6
1523	1522	γ -Cadineno	0,16
1553	1557	Silphiperfol-5-en-3-ol A	0,14
1562	1567	Longipinanol	0,65
1567	1559	Cis-Muurool-5-en-4-alpha-ol	0,17
1570	1561	E-Nerolidol	0,53
1573	1570	Dendrolasina	0,59
1577	1576	Espatulanol	4,57
1583	1582	Oxido de Cariofileno	0,37
1593	1596 F	Salvial-4(14)-en-1-ona	0,4
1597		NI	0,14
1604	1608	Epoxido de humuleno II	0,2
1611	1602	Ledol	0,85
1616	1619	Helifolen-12-al C (anti-syn-syn-)	1,7
1625	1630	Muurola-4,10(14)-dien-1-beta-ol	0,38
1629		NI	1,02
1634	1634	β -Cedren-9-ona	0,12
1636	1636	Gossonorol	0,52
1639	1638	Epi- α -Cadinol	0,91
1644	1652	α -Cadinol	0,28
1648	1652	Himachalol	0,38

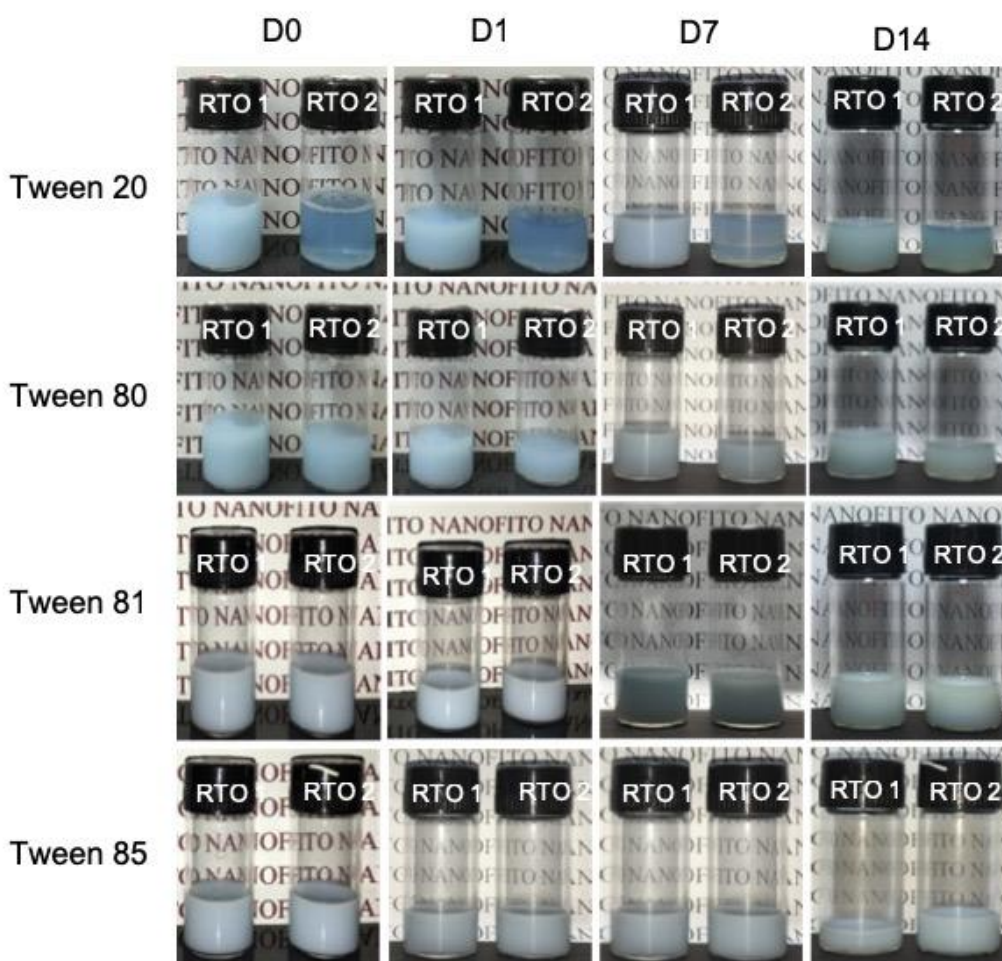
1655	1656	Oxido de α -Bisabolol B	19,33
1667		NI	0,84
1681	1685	α -Bisabolol	11,16
1685		NI	0,15
1687		NI	0,16
1724	1730	Camazuleno	1,9
1742	1748	Oxido de α -Bisabolol A	11,1
1761	1765	β -Costol	0,36
1766	1773	α -Costol	0,11
1794		NI	0,36
1840	1841	Fitona	0,23
1878	1879	Z-Espiroeter	7,74
1890	1895	(E)-Tonghaosu	0,1
1924	1924 F	Metil-Hexadecanoate	0,19
1949		NI	0,43
1960	1959	Acido Hexadecanoico	0,19
2030	2027 F	(E,E)-Geranil linalool	0,15
2091	2095	Methyl linoleate	0,16
2142	2141	Acido oleico	0,64
2296	2300	Tricosane	0,34
2349		NI	0,1
2397	2400	Tetracosane	1,44
2594	2600	Hexacosane	0,28
985	981	Hepten-2-one<6-methyl-5->	0,18
Monoterpenos hidrocarbonados			-

Monoterpenos oxigenados	0,4
Sesquiterpenos hidrocarbonados	24,0
Sesquiterpenos oxigenados	49,4
Outros	-
Total (%)	97,9

IR (C) = Índice de retenção calculado; **IR (L)** = Índice de retenção da literatura.

A figura 7 mostra o aspecto macroscópico de nano-emulsões preparadas com o OEC e tensoativos individuais. Um aspecto azulado foi observado em todas as nano-emulsões, sendo mais pronunciado naquelas preparadas com polissorbato 20 ou 80, especialmente nesta primeira devido sua aparência mais transparente/translúcida. As nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 ou polissorbato 85 se mostraram mais opacas e apresentaram um aspecto leitoso mais pronunciado. As preparadas com polissorbato 85 (RTO 1 e 2) e polissorbato 81 (RTO 1 e 2) apresentaram certo grau de cremagem após 1 dia de armazenamento. Após 7 e 14 dias de armazenamento foi observado que estas nano-emulsões apresentaram cremagem e aderência a parede dos frascos.

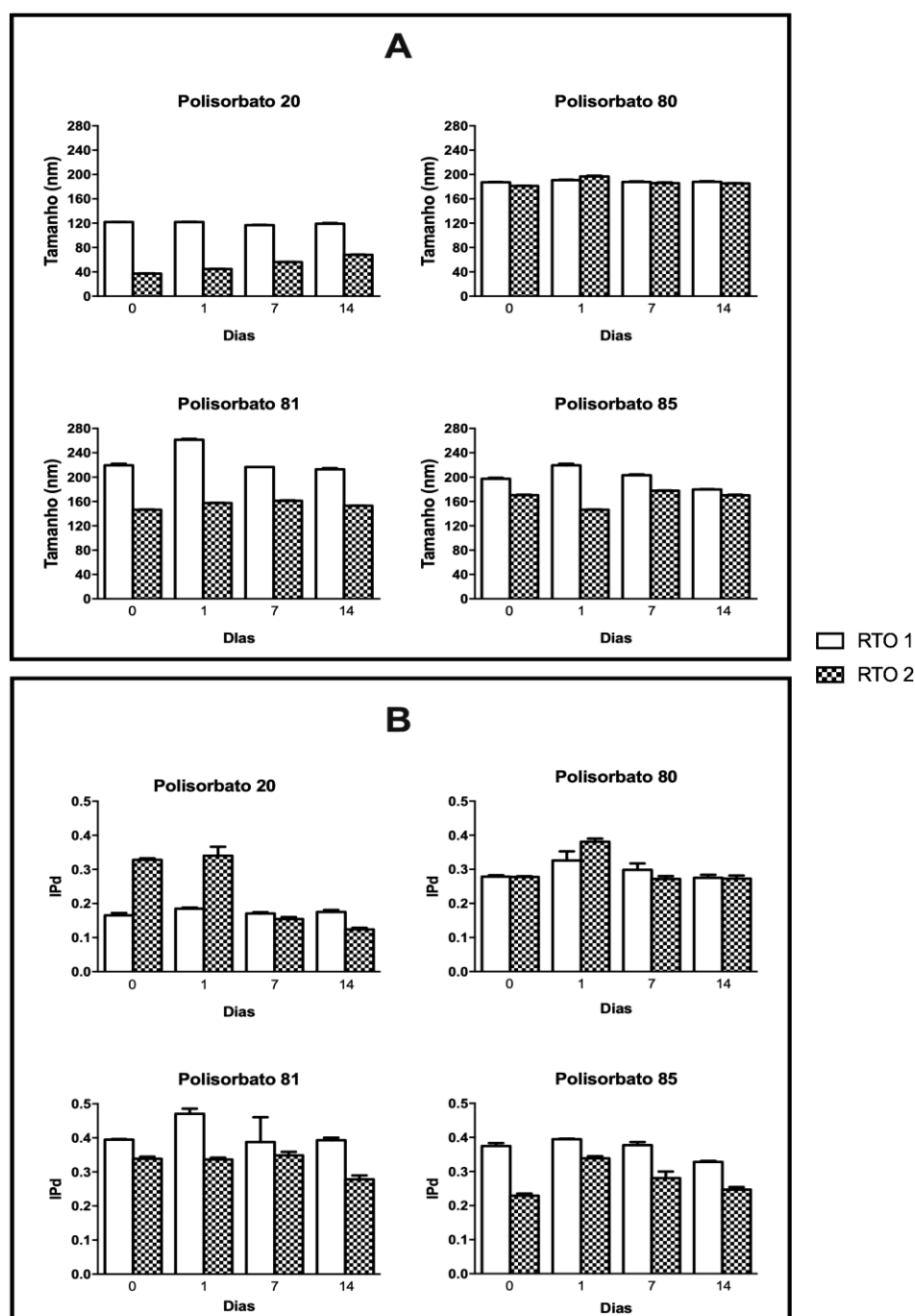
Figura 7 - Aspecto das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.



A figura 8A mostra o tamanho de gotícula das nano-emulsões em diferentes RTO. Uma redução significativa no tamanho ($p < 0.0001$) na RTO 2, quando comparada a RTO 1, foi observada em todos os dias analisados para a nano-emulsão preparada com polissorbato 20. Esta diferença com relação à RTO também foi observada nas nano-emulsões preparadas com polissorbato 81 e polissorbato 85. No entanto isto, não é um ponto crítico devido ao limite de sensibilidade das medidas de EDL. Não foram observadas grandes alterações no tamanho médio associado aos diferentes RTOs para a nano-emulsão preparada com polissorbato 80 nos dias analisados. Apesar de que redução significativa (dia 0, $p < 0,05$) ou aumento significativo (dia 1, $p < 0,05$) foram detectados sob a forma de pequenas variações de tamanho, uma manutenção geral do perfil foi observada, independentemente da RTO. No dia da preparação, observou-se menor tamanho médio de gotícula para as nano-emulsões preparadas com polissorbato 20 (RTO1 = $122,0 \pm 0,2$ nm; RTO 2 = $37,2 \pm 0,8$ nm). As nano-emulsões remanescentes apresentaram tamanho médio em torno de 150 - 220 nm no dia da preparação. O tamanho de nanocápsulas preparadas

com o extrato metanólico das partes aéreas da camomila foi em torno de 186-212 nm (ESMAEILI et al., 2011), enquanto que nanopartículas de prata preparadas com o extrato aquoso das flores apresentaram tamanho médio em torno de 37-70 nm (DOGRU et al., 2017). Portanto, pode-se observar que os valores obtidos no presente estudo estão na mesma faixa dos observados para outros sistemas nanoestruturados preparados com derivados de camomila. A Figura 8B mostra que o menor IPd foi observado para a nano-emulsão preparada com polissorbato 20 na RTO 1. Os valores permaneceram em torno de 0,165-0,185 durante todo o período de armazenamento. Para a nano-emulsão preparada com este tensoativo no SOR2, foi possível observar uma redução no IPd para valores mais baixos (em torno de 0,154-0,124) após 7 e 14 dias de armazenamento. As nano-emulsões restantes apresentaram maiores valores de IPd, no entanto, todas ficaram abaixo de 0,500. Os gráficos de distribuição das formulações feitas com pares de tensoativos estão mostrados no anexo II.

Figura 8 - Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.



A variação do tamanho de gotícula (VT) permitiu a observação do comportamento das gotículas durante o período de armazenamento. Ausência de variação foi observada após 1 dia de armazenamento somente para a nano-emulsão preparada com polissorbato 20 na RTO 1. A maior VT para esta nano-emulsão foi observado somente após 7 dias de armazenamento. Entretanto, esta foi considerada como um valor muito baixo, de 4,7%. Baixas VT também foram observadas para as nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 na RTO 1, onde as maiores alterações foram expressas como um crescimento no

tamanho de gotícula de 1,87% após 1 dia de armazenamento. Um aumento da VT foi observada para a nano-emulsão preparada com polissorbato 20 na RTO 2. Todos os valores de VT estão apresentados na tabela 5.

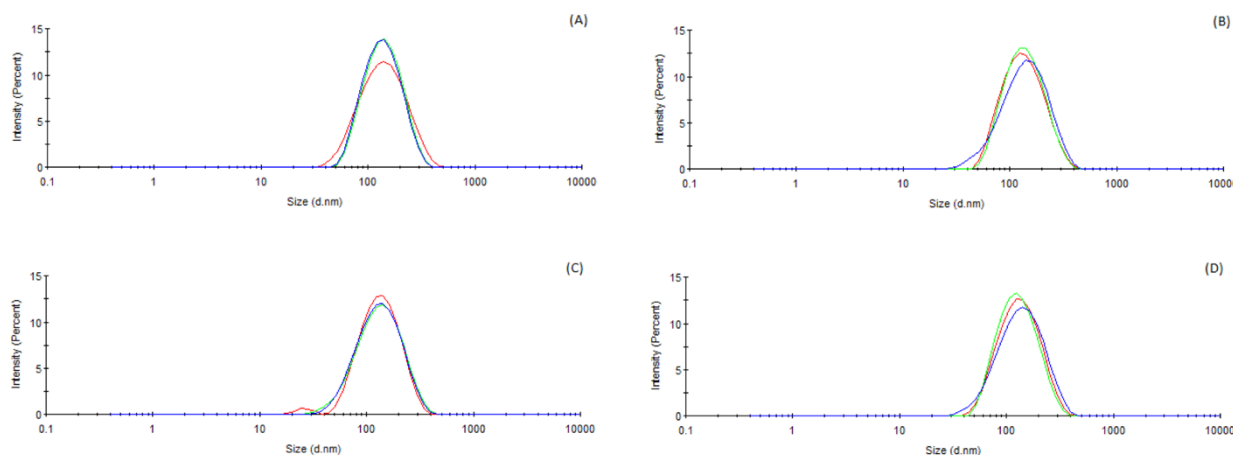
Tabela 5. Variação do tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com tensoativos não iônicos individuais.

Tensoativo	RTO	VT0,1	VT0,7	VT0,14	VT1,7	VT1,14	VT7,14
P20	1	0	-4,18	-2,46	-4,18	-2,46	1,80
	2	19,89**	50,27****	83,06****	25,34****	52,69****	21,82****
P80	1	1,87	0,32	0,32	-1,52	-1,52	0
	2	8,55****	2,54	2,26	-5,54****	-5,80****	-0,27
P81	1	19,13****	-1,32	-3,01*	-17,17****	-18,59****	-1,71
	2	7,52****	10,12****	4,58****	2,42	-2,73	-5,03***
P85	1	11,31****	2,99	-8,87****	-7,47****	-18,13****	-11,52****
	2	-14,09****	4,40**	-0,06	21,53****	16,34****	-4,27**

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

A análise dos gráficos de distribuição do tamanho de gotícula mostra a manutenção da distribuição monomodal (Figura 9) da nano-emulsão preparada com polissorbato 20 (RTO 1). quando comparada as outras nano-emulsões (Anexo I), incluindo aquela preparada com polissorbato 20 na RTO 2.

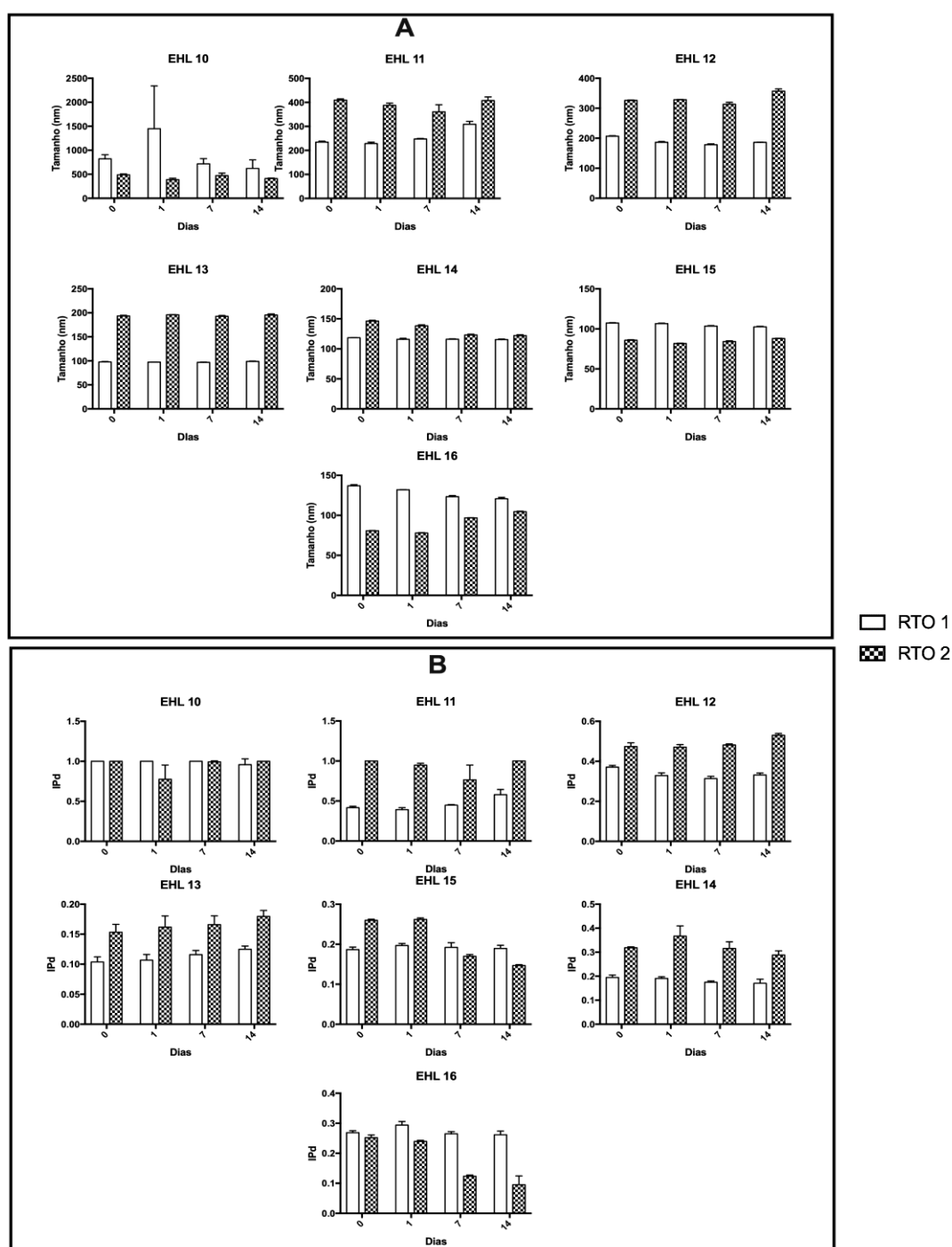
Figura 9 - Gráficos de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão feita com polissorbato 20 (RTO 1).



O tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20/monooleato de sorbitano estão mostrados na figura 10A. As maiores gotículas (na faixa micrométrica) foram encontradas no EHL 10 (RTO 1), com tamanho ao redor de 400-500 nm quando a RTO foi aumentada. A redução no tamanho de gotícula em função do aumento da RTO também foi observada no EHL 15, alcançando o menor valor neste par, com tamanho ao redor de 80-90 nm. Em relação aos valores de EHL de 11-14 foi possível observar que o aumento da RTO induziu o aumento do tamanho de gotícula. Essa diferença foi menos pronunciada no EHL 14, onde o menor tamanho de gotícula foi observado na RTO 1 (< 100 nm).

Os valores de IPd (Figura 10B) da nano-emulsão no EHL 13 (RTO 1) alcançaram valores baixos (ao redor de 0,100) e tiveram um ligeiro aumento de aproximadamente 0,115-0,250 do dia 7 para o dia 14 de armazenamento. Apesar dos valores atribuídos as nano-emulsões preparadas com esse par na RTO 2 serem superiores ao RTO 1, estes forma menores do que 0,200. No entanto, as nano-emulsões de EHL 15 (RTO 2) e EHL 14 (RTO 1) apresentaram uma ligeira tendência a diminuição após 7 dias de armazenamento, alcançando valores abaixo de 0,200. De modo geral foi observado que uma manutenção nos valores de IPd para a nano-emulsão de EHL 15 (SOR 1), permanecendo abaixo de 0,200. A tabela 6 mostra a VT das nano-emulsões preparas com polissorbato 20/monooleato de sorbitano. Uma baixa VT foi observada nas nano-emulsões de EHL 13 e 15 (RTO 1 e 2), enquanto somente na RTO 1 (EHL 14) esses valores baixos foram observados.

Figura 10 - Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20 e monooleato de sorbitano.

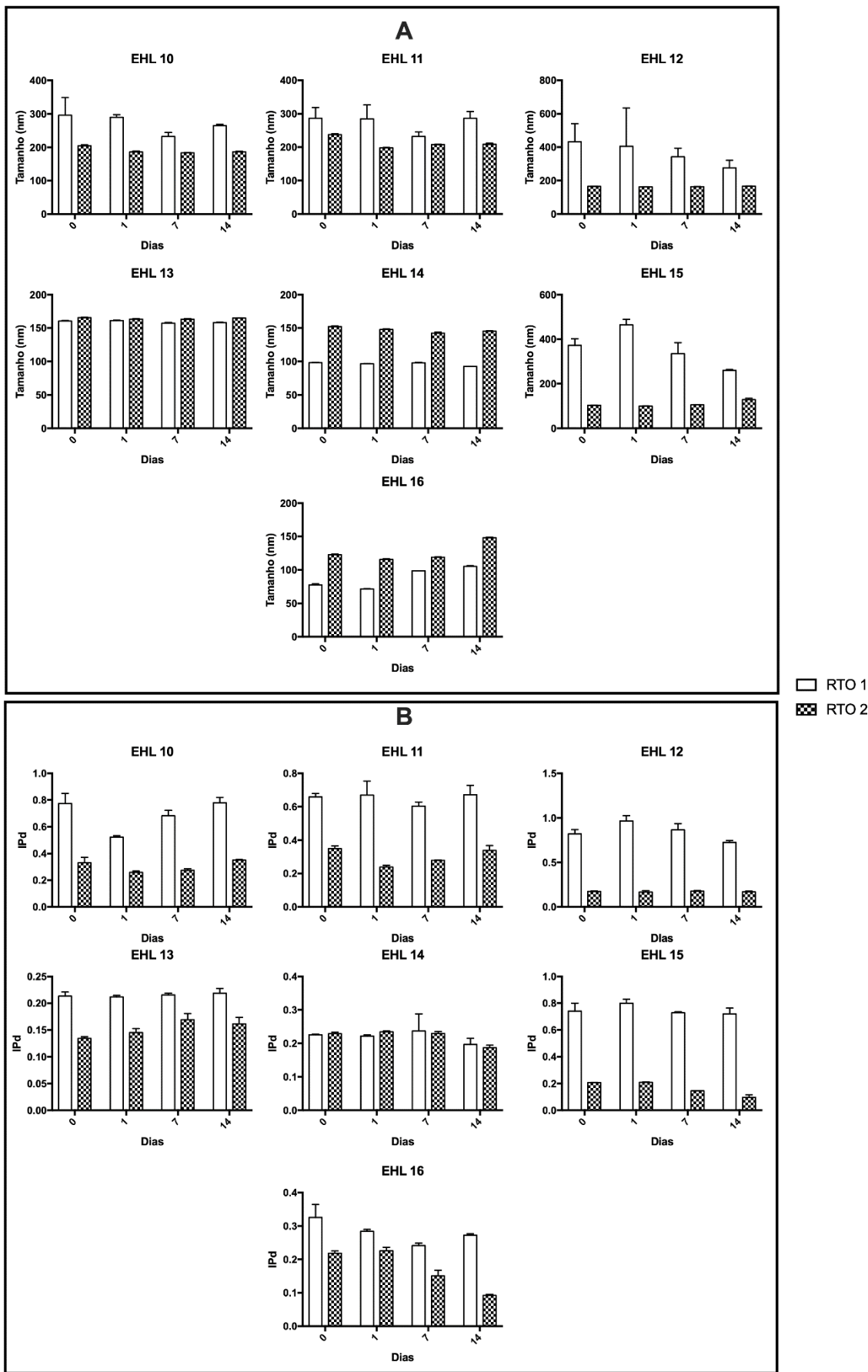


A figura 11A mostra o tamanho médio das gotículas das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20/trioleato de sorbitano. Independente da RTO, nenhuma alteração foi observada no EHL 13, que permaneceu com tamanho abaixo de 200 nm. Na nano-emulsão preparada no EHL 12 (RTO 2), foi possível observar tamanho similar de gotícula aquelas observadas no EHL 13, na mesma faixa e com o mesmo comportamento. No EHL 14, o aumento da RTO induziu a formação de gotículas 50% maiores na RTO 2, quando

comparadas aquelas relacionadas a RTO 1 e embora o tamanho tenha sido de aproximadamente 150 nm.

Na figura 11B estão ilustrados os IPd das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20/trioleato de sorbitano. A nano-emulsão no EHL 12 (RTO 2) não apresentou grandes alterações no IPd, com valores abaixo de 0,200. Apesar dos valores atribuídos a nano-emulsão de EHL 13 (RTO 1) serem levemente superiores a 0,200, ela foi menos suscetível a alterações quando comparada aos valores de IPd relacionado a RTO 2 do mesmo EHL. Esta última apresentou uma leve tendência a aumento, se estabilizando por volta de 0,165. Por outro lado, os valores de IPd para a nano-emulsão de EHL 15 mostraram uma tendência a diminuição de seus valores na RTO 2, alcançando um valor abaixo de 0,100. Independente da RTO, os valores de IPd da nano-emulsão no EHL 14 foram próximas a 0,200. Baixas VT foram observadas nas nano-emulsões de EHL 12 (SOR 2) e EHL 13 (**tabela 6**)

Figura 11 - Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 20 e trioleato de sorbitano.



Tamanho de gotícula próximo ou superior a 200 nm e alto IPd foram observados para todas as nano-emulsões preparadas com polissorbato 80/monooleato de sorbitano, conforme mostrado nas figuras 12A e 12B. A menor VT foi observada nos valores de EHL 10 e 13 na RTO 2. De forma geral, o tamanho de gotícula dos sistemas preparados com polissorbato 80/trioleato de sorbitano (Figura 13A) foram menores quando comparados aos preparados com o sistema polissorbato 80/monooleato de sorbitano. O menor tamanho de partícula foi observado no RTO 1 nos EHLs 10 e 11, quando comparados a RTO 2. Por outro lado, independente da RTO, poucas alterações foram observadas nos outros EHLs desse sistema em função da quantidade de tensoativo. Os valores de IPd mais baixos foram observados no EHL 10 (SOR 1), aproximadamente 0,10-0,170, enquanto os valores observados para o EHL 11 (RTO 1), EHL 12 (RTO 2) e EHL 13 (RTO 1 e 2) permaneceram ao redor de 0,250 (Figura 13B). Baixos valores de VT foram observados nos EHL 10, 11 e 14 (RTO 1), EHL 13 (RTO 2) e EHL 12 (RTO 1 e 2).

Figura 12 - Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 e monooleato de sorbitano.

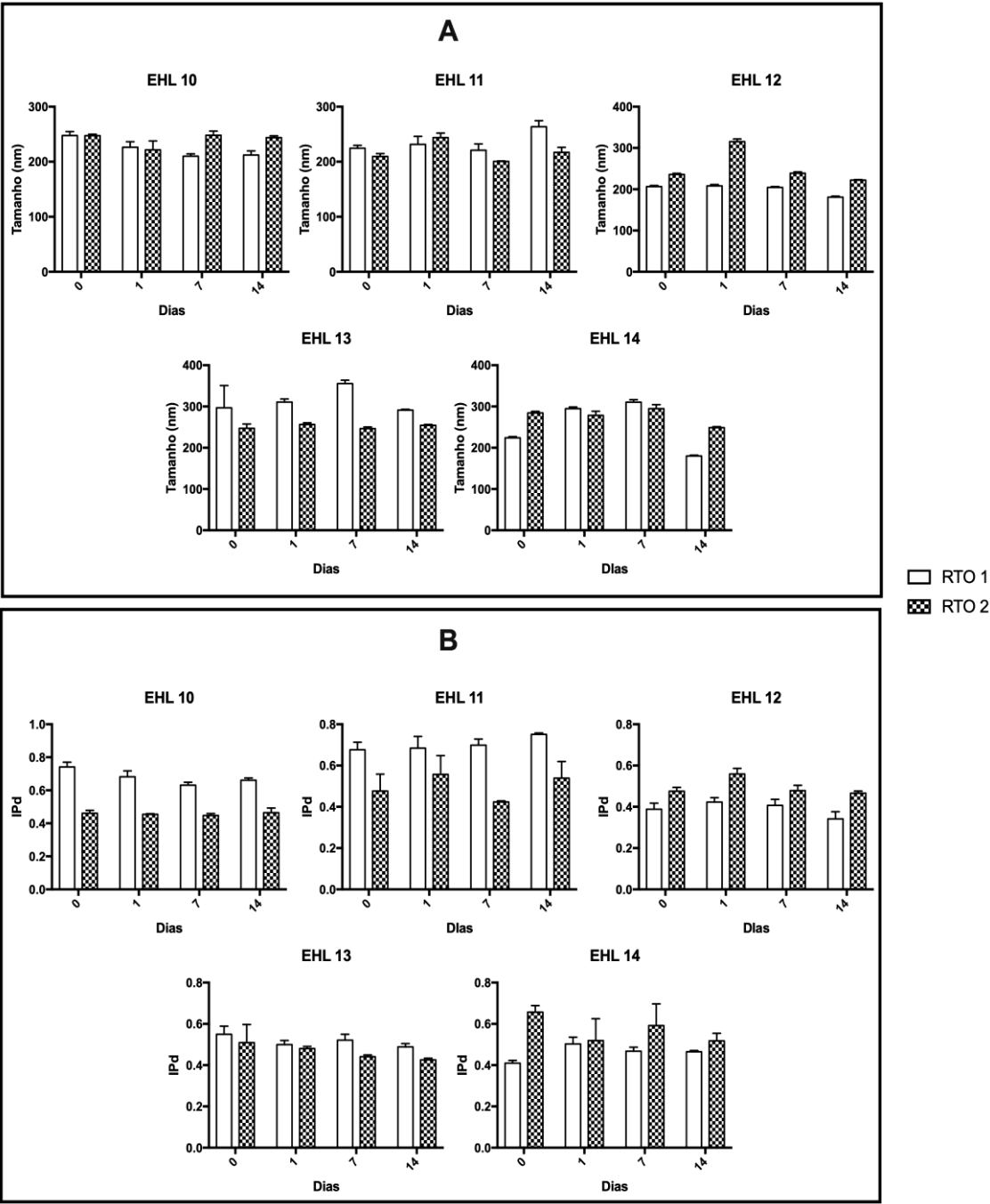


Figura 13 - Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nano-emulsões preparadas com polissorbato 80 e trioleato de sorbitano.

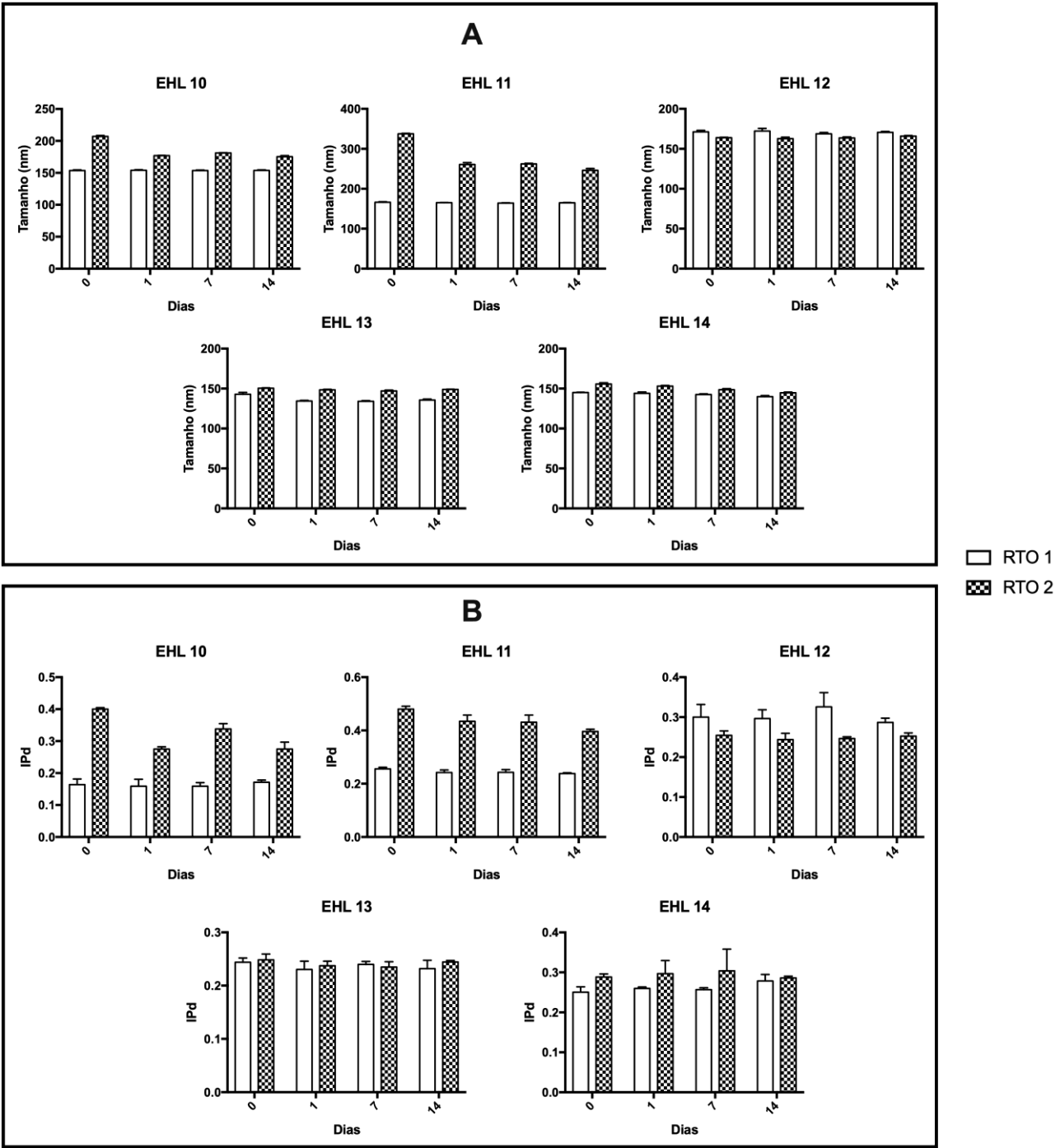


Tabela 6. Variação do tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com pares de tensoativos não iônicos.

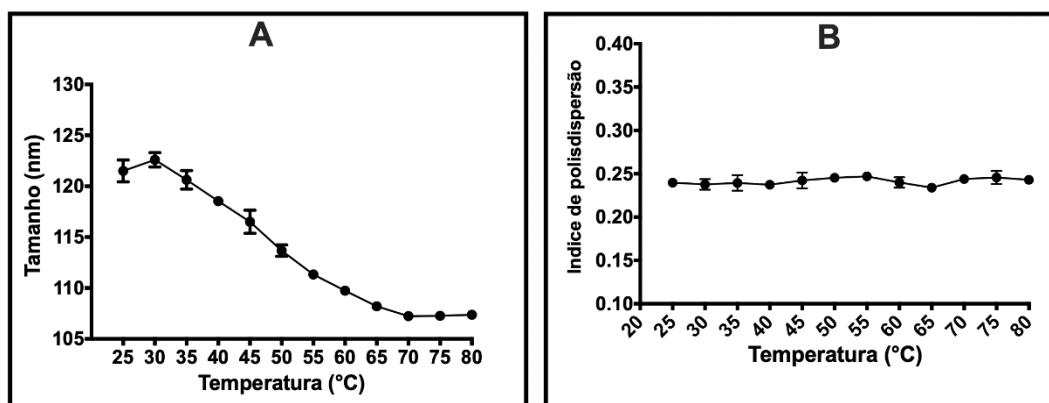
		P80/MS			P80/TS			P20/MS			P20/TS		
	RTO	VG _{0,1}	VG _{0,7}	VG _{0,14}	VG _{0,1}	VG _{0,7}	VG _{0,14}	VG _{0,1}	VG _{0,7}	VG _{0,14}	VG _{0,1}	VG _{0,7}	VG _{0,14}
EHL 10	1	-11,38	-15,13*	-14,37	0,26	0	0,06	76,19****	-13,39	-24,31	22,02	-1,48	-10,80
	2	-3,83	0,24	-1,45*	-14,45****	-12,46****	-15,22****	-20,65	-3,75	-16,08	-8,85	-0,10	-0,08
EHL 11	1	3,16	-1,64	17,31	-0,60	-1,26	-0,84	-2,43	5,58	31,78	-0,005	-18,86	-0,10
	2	16,42	-4,20	3,57	-22,69****	-22,37****	-27,11****	-5,32	-11,94	-0,43	-16,51	-12,59	-12,00
EHL 12	1	0,87	-0,87	-12,40	0,64	-1,40	-0,40	-9,81	-13,68	-9,86	17,02	-20,86	-36,09**
	2	33,70****	1,31	-5,80	-0,61	-0,12	1,28	0,76	-3,86	9,47	-1,39	-1,02	0,60
EHL 13	1	-4,92	8,72****	-10,92	-6,01****	-6,29****	-5,24***	-3,39	-0,77	1,034	0,43	-1,99	-1,49
	2	3,76	-0,24	2,99	-1,39	-2,32	-1,12	1,24	-0,36	1,08	-1,26	-1,32	-0,36
EHL 14	1	31,53****	38,44****	-19,71**	-0,68	-1,79	-3,58	-2,27	-2,19	-2,69	-1,81	-0,29	-5,86
	2	-2,10	3,65	-12,48	-1,66	-4,62***	-7,00****	-5,46	-15,92	-16,548	-2,88	-6,50	-4,53
EHL 15	1	-	-	-	-	-	-	-0,74	-3,63	-4,47	24,55	-1,07E	30,13
		-	-	-	-	-	-	-4,72	-1,82	2,54	-3,23	1,93	21,20
EHL 16		-	-	-	-	-	-	-3,65	-9,93	-11,83	-7,60	27,48	35,99
		-	-	-	-	-	-	-4,72	19,87	29,55	-5,62	-3,01	20,78

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

De acordo com Surh; Decker; McClements, (2017) é desejável que nano-emulsões estáveis contenham a menor quantidade de tensoativos possível. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que de forma geral, a nano-emulsão com melhores características foi aquela preparada com polissorbato 20 e a mesma quantidade de OEC (RTO 1). Além do baixo tamanho de gotícula e baixa variação de tamanho, valores de IPd baixos sugerem nano-emulsões monodispersas com uma tendência maior a estabilidade cinética, enquanto que valores de IPd mais altos são indicativos de nano-emulsões polidispersas com baixa estabilidade (KATSOULI; POLYCHNIATOU; TZIA, 2017, 2018). Por conseguinte, a nano-emulsão preparada com polissorbato 20 na RTO 1 foi escolhida como a nano-emulsão otimizada.

A nano-emulsão otimizada foi submetida a uma rampa linear com o aumento de temperatura. Foi observado que esta não induziu alterações significativas de 25 a 35 °C ($25\text{ °C} = 121,5 \pm 1,0$; $30\text{ °C} = 122,6 \pm 0,7$ e $35\text{ °C} = 120,6 \pm 0,9$) (Figura 14A). Nas temperaturas superiores foi observada uma tendência de redução do tamanho de gotícula até 65 °C, quando permaneceu sem grandes alterações. O índice de polidispersão permaneceu quase constante durante toda a rampa de temperatura (Figura 14B)

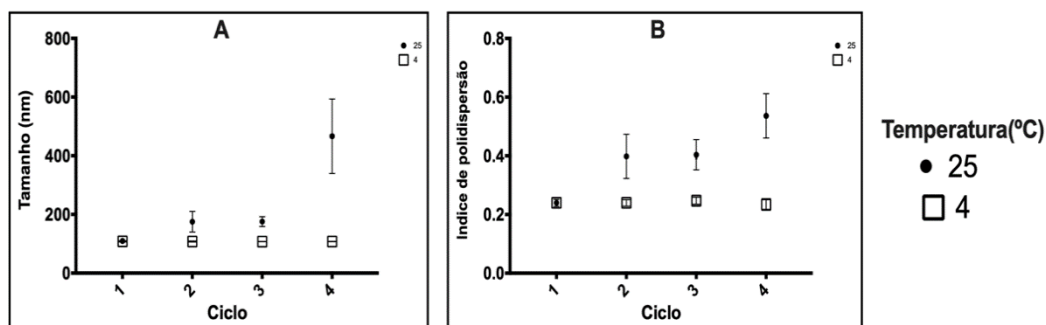
Figura 14 - Tamanho de partícula e índice de polidispersão da nano-emulsão otimizada submetida a rampa linear de aumento da temperatura.



A influência de ciclos de refrigeração/restabelecimento de temperatura ambiente também foi avaliada na formulação otimizada (**Figura 15**). No primeiro ciclo não foram observadas grandes alterações, tanto no tamanho de gotícula ($\pm 110\text{ nm}$) quanto no IPd ($\pm 0,250$) para ambas as temperaturas. No segundo e no terceiro ciclos, o tamanho médio de gotícula aumentou ligeiramente para aproximadamente 175 nm na temperatura de 25°C, enquanto o IPd aumentou cerca de 2x o seu valor quando comparado com o início do experimento. Valores máximos de tamanho de gotícula e IPd foram observados na

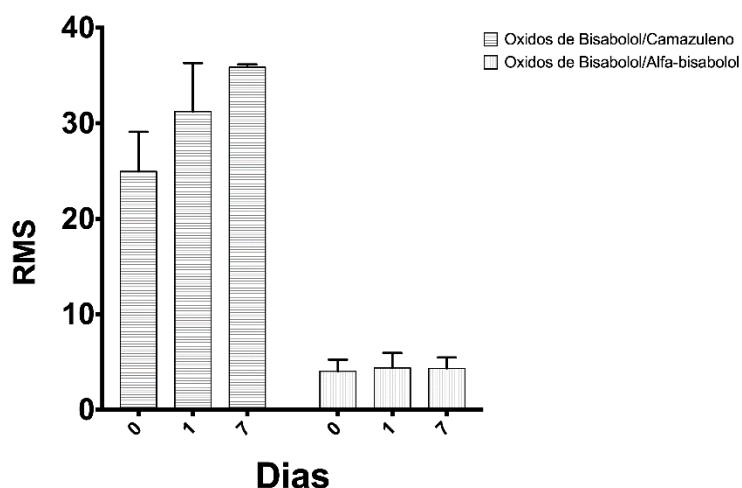
temperatura de 25°C no quarto ciclo, respectivamente ao redor de 470 nm e 0,500. Na temperatura de 4°C, em todos os ciclos, não foram observadas alterações tanto no tamanho de gotícula quanto no IPd, quando comparados aos valores iniciais.

Figura 15 - Tamanho de gotícula e IPd da nano-emulsão otimizada submetida a influência de ciclos de refrigeração/restabelecimento de temperatura ambiente.



Em relação à RMS, uma diferença estatística foi observada somente na relação óxidos de Bisabolol/camazuleno ($p < 0,05$) (**Figura 16**). A análise do gráfico leva a sugestão de que há uma perda maior de camazuleno, quando comparado aos marcadores químicos do OEC. O óxido de bisabolol tem um logP menor (3,88) e solubilidade em água maior (418,89 mg/L) do que o camazuleno, que possui os respectivos valores de 5,36 e 0,2945 mg/L. Portanto, seria de se esperar que a migração dos marcadores químicos para a fase externa aquosa fosse facilitada, quando comparada ao camazuleno. Partindo-se dessa premissa e considerando-se que tanto a facilitação de reações de degradação quanto a perda por volatilização destas substâncias levariam a uma diminuição mais pronunciada da área dos picos do oxido de bisabolol do que da área dos picos do camazuleno, esta hipótese poderia levar a um incremento do valor da RMS atribuída a relação óxidos de Bisabolol/camazuleno. Assim, pode-se sugerir que os marcadores químicos do óleo essencial usado neste trabalho (óxidos de Bisabolol) são mais protegidos que o camazuleno, outro sesquiterpenos encontrado no óleo essencial.

Figura 16 - Variação da relação de metabólitos secundários na nano-emulsão otimizada.



A nano-emulsão otimizada e o OEC apresentaram valores de concentração mínima bactericida (CMB) acima de 2000 µg/mL para ambas as bactérias testadas, sendo assim nenhuma diferença pôde ser observada. No entanto, apesar dos valores de concentração mínima inibitória (CMI) do OEC também serem superiores a 2000 µg/mL frente a *S. aureus* e *E. coli*, foi possível observar que os valores de CMI para a nano-emulsão foram de 2000 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente, para esses dois microrganismos (Tabela 7). O tensoativo utilizado para fazer a nano-emulsão também foi testado na maior concentração da nano-emulsão e do OEC e não apresentou nenhuma atividade.

Tabela 7. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida da nano-emulsão e do OEC.

	CMI and CMB (ug mL ⁻¹)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Nano-emulsão	2000	> 2000	1000	> 2000
OEC	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000

A nano-emulsificação de óleos essenciais concede diversas vantagens quando comparado a este em sua forma não nano-estruturada. Além da notável melhora na estabilidade física, a atividade biológica (como a atividade antibacteriana) pode ser otimizada (DONSÌ; FERRARI, 2016). Estudos recentes têm demonstrado que a CMI de nano-emulsões apresentam valores menores quando comparados aos óleos essenciais não nano-emulsionados (MOGHIMI et al., 2016; MOGHIMI; ALIAHMADI; RAFATI, 2017;

JEMAA et al., 2018; NIRMAL et al., 2018). Além disso, em relação a produtos nanoestruturados a base de derivados de camomila, observou-se que nanopartículas de prata apresentaram atividade antimicrobiana melhor do que o extrato utilizado para a síntese destas (DOGRU et al., 2017). Neste contexto pode ser observado que a nano-emulsificação do OEC melhorou a atividade antibacteriana, evidenciada pelo fato que a nano-emulsão apresentou atividade antibacteriana ao menos duas vezes maior frente a *E.coli* do que o óleo essencial.

Acreditamos que a auto-nanoemulsificação sem necessidade de utilização de tensoativos pode fornecer informações valiosas relacionadas ao desenvolvimento desse tipo de sistema coloidal, o que pode nortear o desenvolvimento de outros sistemas. Alguns parâmetros do processo podem ser modificados para obter gotículas com distribuição mais estreita e sistemas mais estáveis ou até mesmo facilitar o método de nano-emulsificação e/ou tipo de tensoativo usado se uma nano-emulsão livre de tensoativo desejável não for alcançada. No entanto, algumas perspectivas podem ser abertas com este trabalho, como:

“I” a avaliação do etanol ou outros solventes verdes / alimentícios como um solvente anfifílico;

“II” caracterização do perfil de terpenos da fase externa até que seja atingido um equilíbrio;

Este trabalho também possibilitou a obtenção de uma série de nano-emulsões com indicativo de estabilidade cinética, onde aquela preparada com óleo essencial de camomila e polissorbato 20 mostrou-se vantajosa em termos de custos pela questão do tensoativo individual envolvido e boas características. As suposições de uma possível proteção das substâncias majoritárias da espécie (óxidos de bisabolol) quando comparadas ao camazuleno, boa performance em estudos de estresse térmico e que a nano-emulsificação do OEC levou a uma melhora de performance em relação ao teste antibacteriano

Desse modo, esperamos não apenas contribuir para o primeiro relato de um estudo sobre as propriedades de nano-emulsões a base dessa importante matéria-prima vegetal, mas abrem-se perspectivas para utilização de nano-emulsões obtidas nesse estudo como protótipos promissores para produtos inovadores.

REFERÊNCIAS

ADHAVAN, P.; KAUR, G.; PRINCY, A.; MURUGAN, R. Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. **Industrial Crops and Products**, v. 100, p. 106–116, 2017.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª ed., 2º Supl. 2017. p 1016.

RAHNAMA, S.; MOKHTARI, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Matricaria chamomilla extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Biomedicine and Aging Pathology**, v. 4, n. 4, p. 355–360, 2014.

ALIHEIDARI, N.; FAZAELI, M.; AHMADI, R.; GHASEMLOU, M.; EMAM-DJOMEH, Z. Comparative evaluation on fatty acid and Matricaria recutita essential oil incorporated into casein-based film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 69–75, 2013.

AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 152–159, 2017.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, v. 76, p. 1–12, 2017.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; LANJARI-PÉREZ, Y.; MARTÍN-BELLOSO, O. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. **Food Chemistry**, v. 266, n. February, p. 466–474, 2018.

ASGHARZADE, S.; RABIEI, Z.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Effects of Matricaria chamomilla extract on motor coordination impairment induced by scopolamine in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 10, p. 829–833, out. 2015.

BENJEMAA, M.; NEVES, M. A.; FALLEH, H.; ISODA, H.; KSOURI, R.; NAKAJIMA, M. Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. January, p. 414–421, 2018.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 44, 2011.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BITENCOURT, A. P. R.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; CARVALHO, J. C. T.; GOMES, A. T. A.; FERREIRA, I. M.; RIBEIRO-COSTA, R. M.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C.; FERNANDES, C. P. Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method. **Food Chemistry**, v. 257, 2018.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CIRIC, A.; BARREIRA, J. C. M.; SOKOVIC, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 114–124, 2015.

CALLENDER, S. P.; MATHEWS, J. A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S. D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, 2017.

CAPUZZO, A.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. **Natural product research**, v. 28, n. 24, p. 2321–3, 2014.

CHANDRASHEKHAR, V. M.; HALAGALI, K. S.; NIDAVANI, R. B.; SHALAVADI, M. H.; BIRADAR, B. S.; BISWAS, D.; MUCHCHANDI, I. S. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 336–340, 2011.

CHANDRASHEKHAR, V. M.; RANPARIYA, V. L.; GANAPATY, S.; PARASHAR, A.; MUCHANDI, A. A. Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 645–651, 2010.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility: Tests for Bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COUVREUR, P.; STELLA, B.; REDDY, L. H.; HILLIAIREAU, H.; DUBERNET, C.; DESMAËLE, D.; LEPÊTRE-MOUELHI, S.; ROCCO, F.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; CLAYETTE, P.; ROSILIO, V.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.-M.; CATTEL, L. Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics. **Nano Letters**, v. 6, n. 11, p. 2544–2548, nov. 2006.

DAS, M. **Chamomile: Medicinal, Biochemical, and Agricultural Aspects**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

DOGRU, E.; DEMIRBAS, A.; ALTINSOY, B.; DUMAN, F.; OCSOY, I. Formation of *Matricaria chamomilla* extract-incorporated Ag nanoparticles and size-dependent enhanced antimicrobial property. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. May, p. 78–83, 2017.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.

DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; FERREIRA, A. M.; SOUTO, R. N. P.; FALCÃO, D. Q.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189–192, mar. 2015.

DUMAN, F.; OCSOY, I.; OZTURK, F. Chamomile flower extract-directed CuO nanoparticle formation for its antioxidant and DNA cleavage properties. **Materials Science & Engineering C**, v. 60, p. 333–338, 2016.

ESMAEILI, A.; SAREMNIA, B.; KOOHIAN, A.; REZAZADEH, S. Mechanism of nanocapsules of *Matricaria recutita* L. extract formation by the emulsion-diffusion process. **Superlattices and Microstructures**, v. 50, n. 4, p. 340–349, 2011.

FARHOUDI, R. Chemical Constituents and Antioxidant Properties of *Matricaria recutita* and *Chamaemelum nobile* Essential Oil Growing Wild in the South West of Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 531–537, 2013.

FORMISANO, C.; DELFINE, S.; OLIVIERO, F.; TENORE, G. C.; RIGANO, D.; SENATORE, F. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 256–263, jan. 2015.

FOTAKIS, C.; TSIGRIMANI, D.; TSIKA, T.; LANTZOURAKI, D. Z.; STRATI, I. F.; MAKRIS, C.; TAGKOULI, D.; PROESTOS, C.; SINANOGLU, V. J.; ZOUMPOULAKIS, P. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. **Food Chemistry**, v. 211, n. 1, p. 963–971, 16 nov. 2016.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. **Chamomile: Industrial Profiles**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

GARCIA, N. O. S.; FERNANDES, C. P.; DA CONCEIÇÃO, E. C. Is it possible to obtain nanodispersions with jaboticaba peel's extract using low energy methods and absence of any high cost equipment? **Food Chemistry**, v. 276, n. April 2018, p. 475–484, 2019.

GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T.; SCHLEGEL, V. Steam distillation extraction kinetics regression models to predict essential oil yield, composition, and bioactivity of chamomile oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 61–67, 2014.

GHOSH, V.; SUGUMAR, S.; CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsions : Biobased Oil Nanoemulsion Preparation , Characterization , and Application. In: KHARISOV, B. I.; KHARISOV, O. V.; ORTIZ-MENDEZ, U. (Ed.). **CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology**. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. P. 687-700.

GRIFFIN, W. C. CLASSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE AGENTS BY “HLB”. **The Official Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 01, n. 05, p. 311–326, 1949.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; MARIA, A.; SANTOS-BUELGA, C.;

JOÃO, M.; QUEIROZ, R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Infusion and decoction of wild German chamomile : Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 136, p. 947–954, 2013.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117–122, 2015.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; HENCHION, M.; SPENCE, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, p. 226-241, 2014.

HASHEMI GAHRUIE, H.; ZIAEE, E.; ESKANDARI, M. H.; HOSSEINI, S. M. H. Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with Zataria multiflora essential oil nanoemulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 93–103, 2017.

HILBIG, J.; MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; WEISS, J.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 52–59, 2016.

HOU, W.; XU, J. Surfactant-free microemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 67–74, 2016.

IRMISCH, S.; KRAUSE, S. T.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G. The organ-specific expression of terpene synthase genes contributes to the terpene hydrocarbon composition of chamomile essential oils. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 84, 2012.

JABRI, M.-A.; SAKLY, M.; MARZOUKI, L.; SEBAI, H. Chamomile (Matricaria recutita L.) decoction extract inhibits in vitro intestinal glucose absorption and attenuates high fat diet-induced lipotoxicity and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 153–159, mar. 2017.

JAMALIAN, A.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAIMAND, K.; PASHOOTAN, N.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Chemical composition and antifungal activity of Matricaria recutita flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 22, n. 4, p. 308–315, 2012.

JEMAA, M. Ben; FALLEH, H.; SERAIRI, R.; NEVES, M. A.; SNOUSSI, M.; ISODA, H.; NAKAJIMA, M.; KSOURI, R. Nanoencapsulated Thymus capitatus essential oil as natural preservative. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 92–97, 2018.

KATSOULI, M.; POLYCHNIATOU, V.; TZIA, C. Influence of surface-active phenolic acids and aqueous phase ratio on w/o nano-emulsions properties; model fitting and prediction of nano-emulsions oxidation stability. **Journal of Food Engineering**, v. 214, p. 40–46, 2017.

KATSOULI, M.; POLYCHNIATOU, V.; TZIA, C. Optimization of water in olive oil nano-emulsions composition with bioactive compounds by response surface methodology. **LWT**

- **Food Science and Technology**, v. 89, p. 740–748, 2018.

KAYALI, I.; JYOTHI, C. K.; QAMHIEH, K.; OLSSON, U. Surfactant-free alternative fuel: Phase behavior and diffusion properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 463, p. 173–179, 2016.

KAZEMI, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Matricaria recutita*. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 8, p. 1784–1792, 2015.

KNIGHT, K. M.; CARUANA, D. J. Formation and characteristion of surfactantless oil-in-water and water-in-oil emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 301, n. 1–3, p. 352–360, 2007.

KOGIANNOU, D. A. A.; KALOGEROPOULOS, N.; KEFALAS, P.; POLISSIOU, M. G.; KALIORA, A. C. Herbal infusions ; their phenolic profile , antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 152–159, 2013.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331–352, 2016.

KRICKL, S.; TOURAUD, D.; BAUDUIN, P.; ZINN, T.; KUNZ, W. Enzyme activity of horseradish peroxidase in surfactant-free microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 516, p. 466–475, 2018.

KWAN, A.; DAVIDOV-PARDO, G. Controlled release of flavor oil nanoemulsions encapsulated in filled soluble hydrogels. **Food Chemistry**, v. 250, n. November 2017, p. 46–53, 2018.

LIU, Y.; XU, J.; DENG, H.; SONG, J.; HOU, W. A surfactant-free microemulsion composed of isopentyl acetate, N -propanol, and water. **RSC Advances**, v. 8, n. 3, p. 1371–1377, 2018.

LUCIA, A.; ARGUDO, P. G.; GUZMÁN, E.; RUBIO, R. G.; ORTEGA, F. Formation of surfactant free microemulsions in the ternary system water/eugenol/ethanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 521, p. 133–140, 2017.

LUMPERT, M.; KREFT, S. Folk use of medicinal plants in Karst and Gorjanci, Slovenia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 13, n. 1, 2017.

MAALI, A; MOSAVIAN, M. T. H. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 92–105, 2013.

MAKSIMENKO, A.; MOUGIN, J.; MURA, S.; SLIWINSKI, E.; LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; LEPÊTRE, S.; ZOUHIRI, F.; DESMAËLE, D.; COUVREUR, P. Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 346–353, jul. 2013.

MANAARGADOO-CATIN, M.; ALI-CHERIF, A.; POUGNAS, J. L.; PERRIN, C. Hemolysis by surfactants - A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 1–16, 2016.

MAO, J. J.; XIE, S. X.; KEEFE, J. R.; SOELLER, I.; LI, Q. S.; AMSTERDAM, J. D. Long-term chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) treatment for generalized anxiety disorder: A randomized clinical trial. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1735–1742, 2016.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. 1^a Ed. Boca Raton, : CRC Press, 1999.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the Bioactivity and Potencial Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 519–530, 2006.

MEHMOOD, T. Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 183, p. 1–7, 2015.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; RAFATI, H. Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 69–76, 2016.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; RAFATI, H. Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans-cinnamaldehyde: 1,8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 415–421, 2017.

MOLET-RODRÍGUEZ, A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Beverage Emulsions: Key Aspects of Their Formulation and Physicochemical Stability. **Beverages**, v. 4, n. 3, p. 70, 2018.

NAZ, Z.; FAISAL, M. S.; MUHEEM, A.; SINGH, S.; KHAR, R. K.; AHMAD, F. J. Determination of (-) A-Bisabolol in *Matricaria Chamomile* Oil and in Nanoformulation By Hptlc Method: It'S Application in Ex Vivo Studies. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 06, 2015.

NIRMAL, N. P.; MEREDDY, R.; LI, L.; SULTANBAWA, Y. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 254, n. January, p. 1–7, 2018.

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

PARDO-DE-SANTAYANA, M.; MORALES, R. Chamomiles in Spain: he Dynamics of Plant Nomenclature. In: PARDO-DE-SANTAYANA, M.; PIERONI, A.; PURI, R. K. (Ed.).

Ethnobotany in the New Europe: People, Health, and wild Plant Resources. 1^a ed. New York: Berghahn, 2010. P. 282-306.

PETSCHENKA, G.; AGRAWAL, A. A. How herbivores coopt plant defenses: Natural selection, specialization, and sequestration. **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 17–24, 2016.

PIERONI, A.; SÕUKAND, R.; QUAVE, C. L.; HAJDARI, A.; MUSTAFA, B. Traditional food uses of wild plants among the Gorani of South Kosovo. **Appetite**, v. 108, p. 83–92, 2017.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2013.

RAAL, A.; ORAV, A.; PÜSSA, T.; VALNER, C.; MALMISTE, B.; ARAK, E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 632–638, 2012a.

RAHMATI, M.; AZIZI, M.; KHAYYAT, M. H.; NEMATI, H.; ASILI, J. Yield and oil constituents of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) flowers depending on nitrogen application, plant density and climate conditions. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 14, n. 6, p. 731–741, 2011.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 749–757, 2012a.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 326–334, 2012b.

RAVINDRAN, P. N.; DIVAKARAN, M.; PILLAI, G. S. Other herbs and spices: achiote to Szechuan pepper. In: **Handbook of Herbs and Spices**. 2^a ed. Elsevier, 2012. p. 534–556.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 437–445, 2013.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Current Opinion in Colloid & Interface Science Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 61–72, 2010.

SAKAI, T. Surfactant-free emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 228–235, 2008.

SANCHEZ-DOMINGUEZ, MARGARITA; RODRIGUEZ-ABREU, C. Series Page. In: **Nanocolloids: A meeting point for scientists and technologists**. [s.l.: s.n.]p. iii.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.

SEDAGHAT DOOST, A.; DEWETTINCK, K.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN DER MEEREN, P. Influence of non-ionic emulsifier type on the stability of cinnamaldehyde nanoemulsions: A comparison of polysorbate 80 and hydrophobically modified inulin. **Food Chemistry**, v. 258, n. March, p. 237–244, 2018.

SHARIFI, F.; SIMBAR, M.; MOJAB, F.; MAJD, H. A. Comparison of the effects of *Matricaria chamomila* (Chamomile) extract and mefenamic acid on the intensity of premenstrual syndrome. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 20, n. 1, p. 81–88, 2014.

SHEN, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1237–1243, 2011.

SHOARA, R.; HASHEMPUR, M. H.; ASHRAF, A.; SALEHI, A.; DEHSHAHRI, S.; HABIBAGAH, Z. Efficacy and safety of topical *Matricaria chamomilla* L. (chamomile) oil for knee osteoarthritis: A randomized controlled clinical trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 21, n. 3, p. 181–187, 2015.

SHTAY, R.; KEPPLER, J. K.; SCHRADER, K.; SCHWARZ, K. Encapsulation of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in solid lipid nanoparticles for food applications. **Journal of Food Engineering**, v. 244, n. August 2018, p. 91–100, 2019.

SHU, G.; KHALID, N.; CHEN, Z.; NEVES, M. A.; BARROW, C. J.; NAKAJIMA, M. Formulation and characterization of astaxanthin-enriched nanoemulsions stabilized using ginseng saponins as natural emulsifiers. **Food Chemistry**, v. 255, n. January, p. 67–74, 2018.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification- evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 130–135, 2011.

SINGH, O.; KHANAM, Z.; MISRA, N.; SRIVASTAVA, M. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 82, 2011.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current**

Opinion in Colloid and Interface Science, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SOLÈ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1–3, p. 138–143, 2006.

SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 133–139, 2012.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 3, n. 6, p. 895–901, 28 set. 2010.

STANOJEVIC, L. P.; MARJANOVIC-BALABAN, Z. R.; KALABA, V. D.; STANOJEVIC, J. S.; CVETKOVIC, D. J. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 8, p. 2017–2028, 16 nov. 2016.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1408–1416, 2017.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TIAN, H.; LI, D.; XU, T.; HU, J.; RONG, Y.; ZHAO, B. Citral stabilization and characterization of nanoemulsions stabilized by a mixture of gelatin and Tween 20 in an acidic system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 2991–2998, 2017.

TOMIČ, M.; POPOVIČ, V.; PETROVIČ, S.; STEPANOVIČ-PETROVIČ, R.; MICOV, A.; PAVLOVIČ-DROBAC, M.; COULADIS, M. Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 759–766, 2014.

TSIVELIKA, N.; SARROU, E.; GUSHEVA, K.; PANKOU, C.; KOUTSOS, T.; CHATZOPOULOU, P.; MAVROMATIS, A. Phenotypic variation of wild Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) populations and their evaluation for medicinally important essential oil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 80, n. June, p. 21–28, 2018.

TURINA, A. del V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101–113, 2006.

UMAGILIYAGE, A. L.; BECERRA-MORA, N.; KOHLI, P.; FISHER, D. J.; CHOUDHARY,

R. Antimicrobial efficacy of liposomes containing D-limonene and its effect on the storage life of blueberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 128, p. 130–137, 2017.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

WANG, L.; DONG, J.; CHEN, J.; EASTOE, J.; LI, X. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 443–448, 2009.

WESOLOWSKA, A.; GRZESZCZUK, M.; KULPA, D. Propagation method and distillation apparatus type affect essential oil from different parts of *Matricaria recutita* L. plants. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 179–194, 2015.

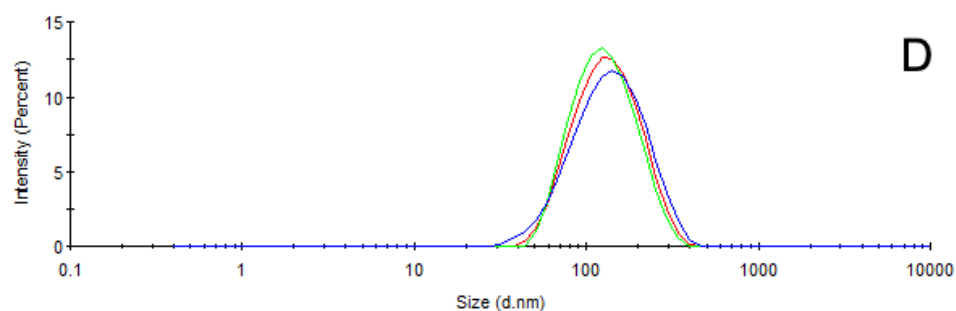
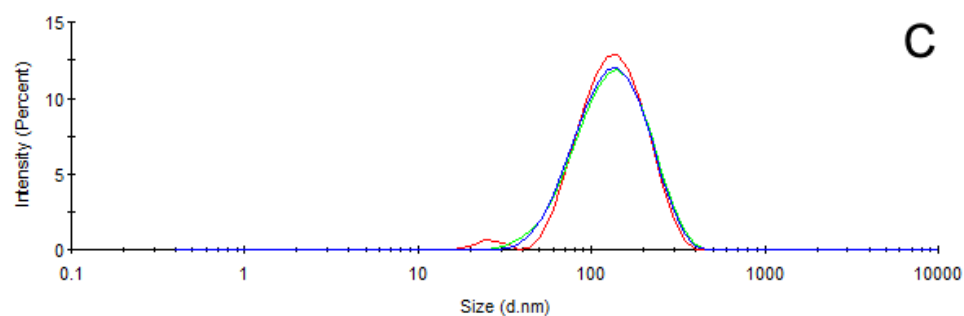
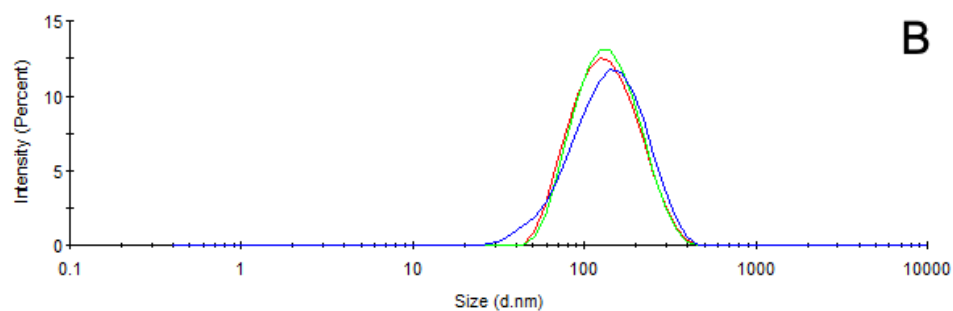
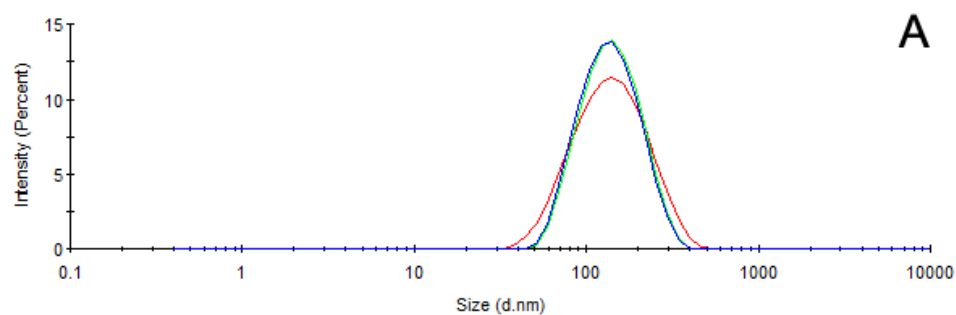
YANGILAR, F.; YILDIZ, P. O. Effects of using combined essential oils on quality parameters of bio-yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, p. e13332, jan. 2018.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T. K.; DALCANTON, F.; DOS ANJOS, R. S.; GRACHER RIELLA, H.; DE ARAÚJO, P. H. H.; DE OLIVEIRA, D.; ANTÔNIO FIORI, M. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. August, p. 51–60, 2018.

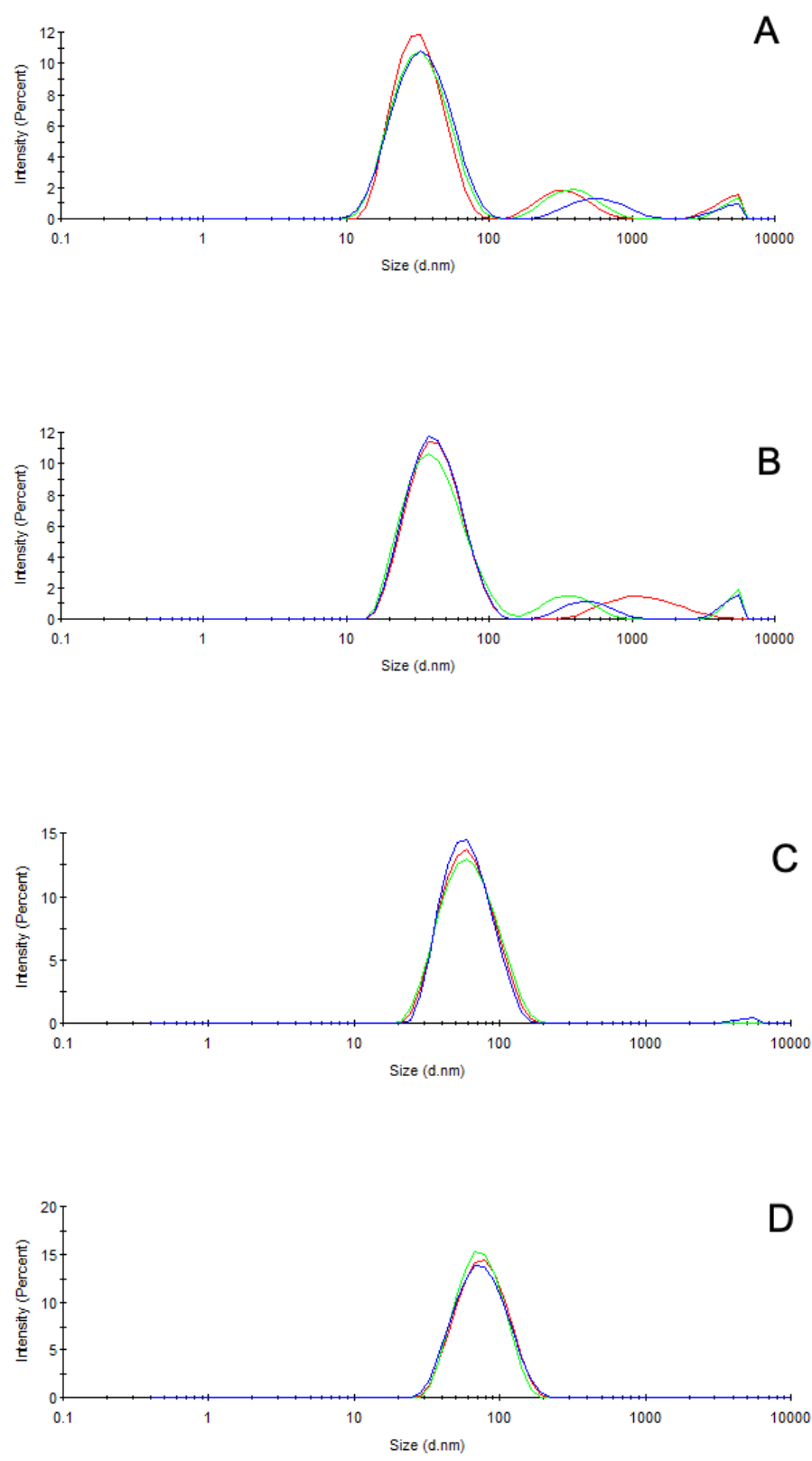
ZHANG, S.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 316–322, 2017.

Anexo I - Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações feitas com Polissorbato20 (RTO 1) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)

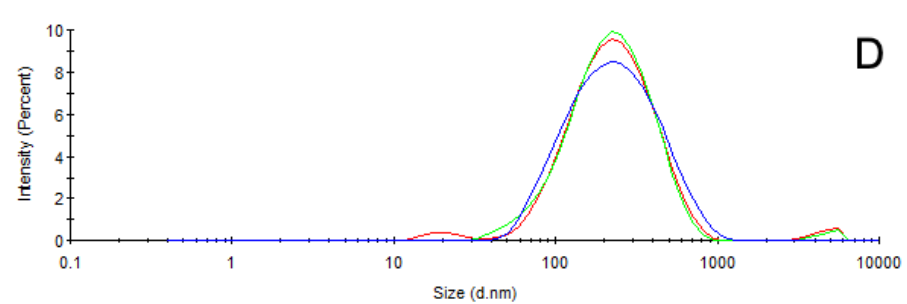
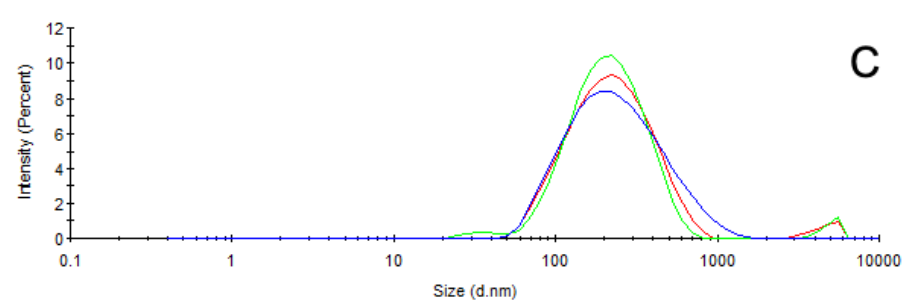
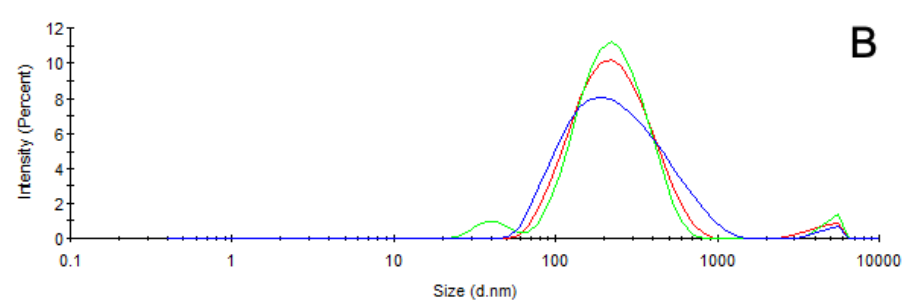
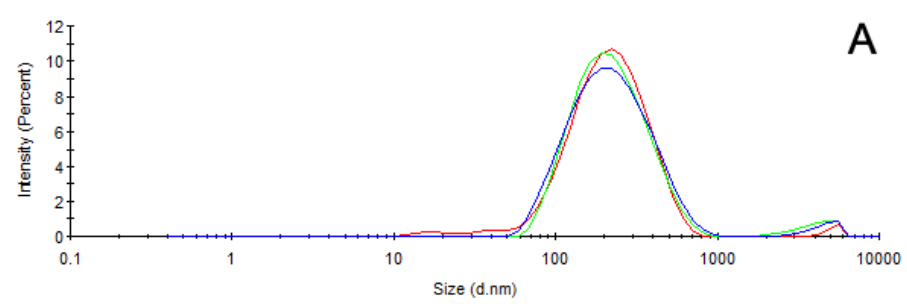
Polissorbato20 (RTO 1) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



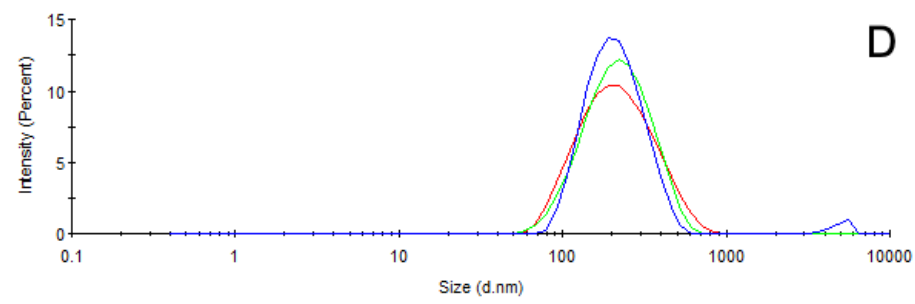
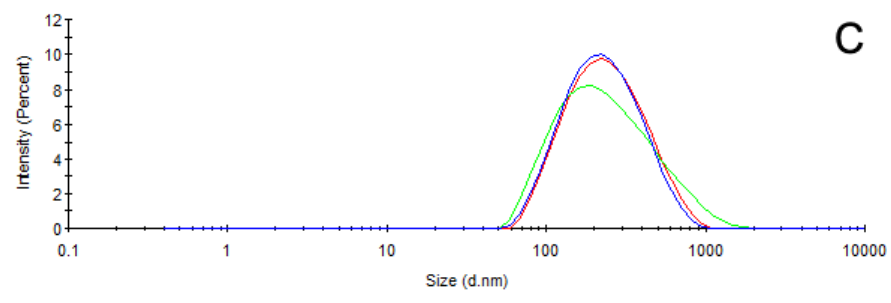
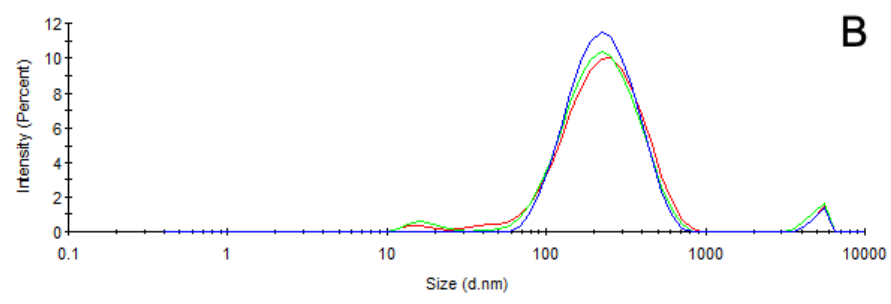
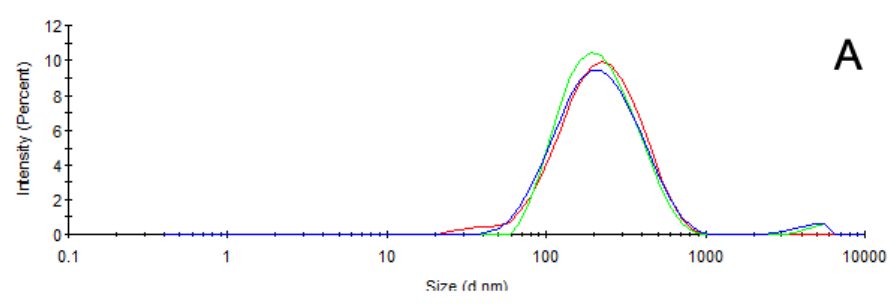
Polissorbato20 (RTO 2) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



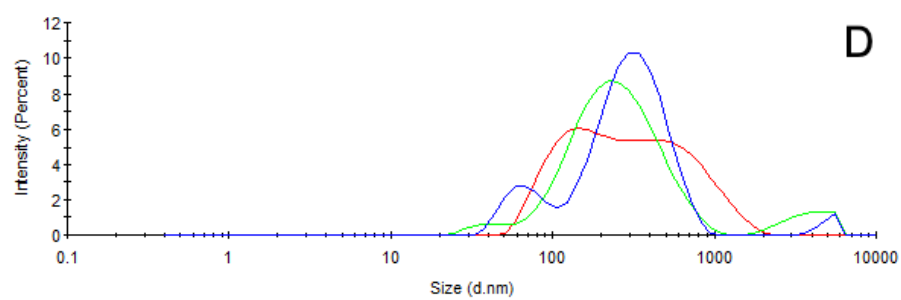
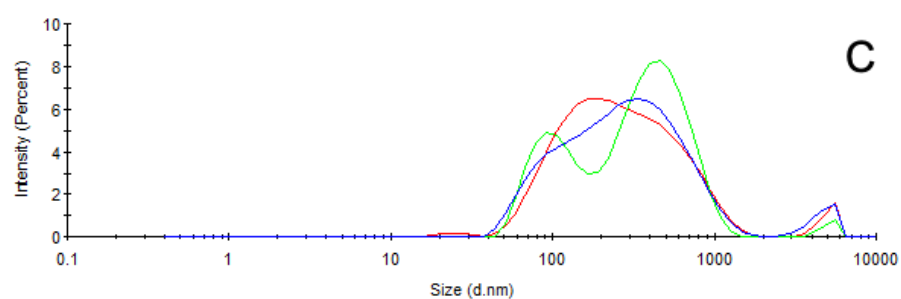
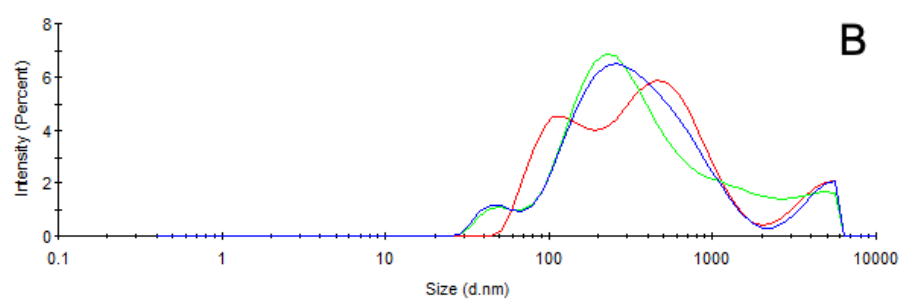
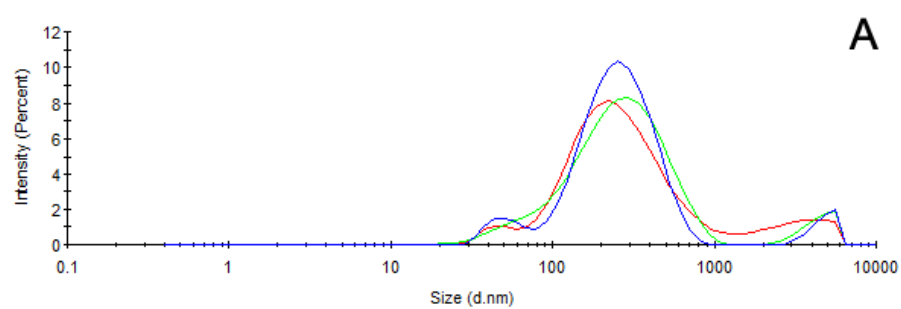
Polissorbato80 (RTO 1) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



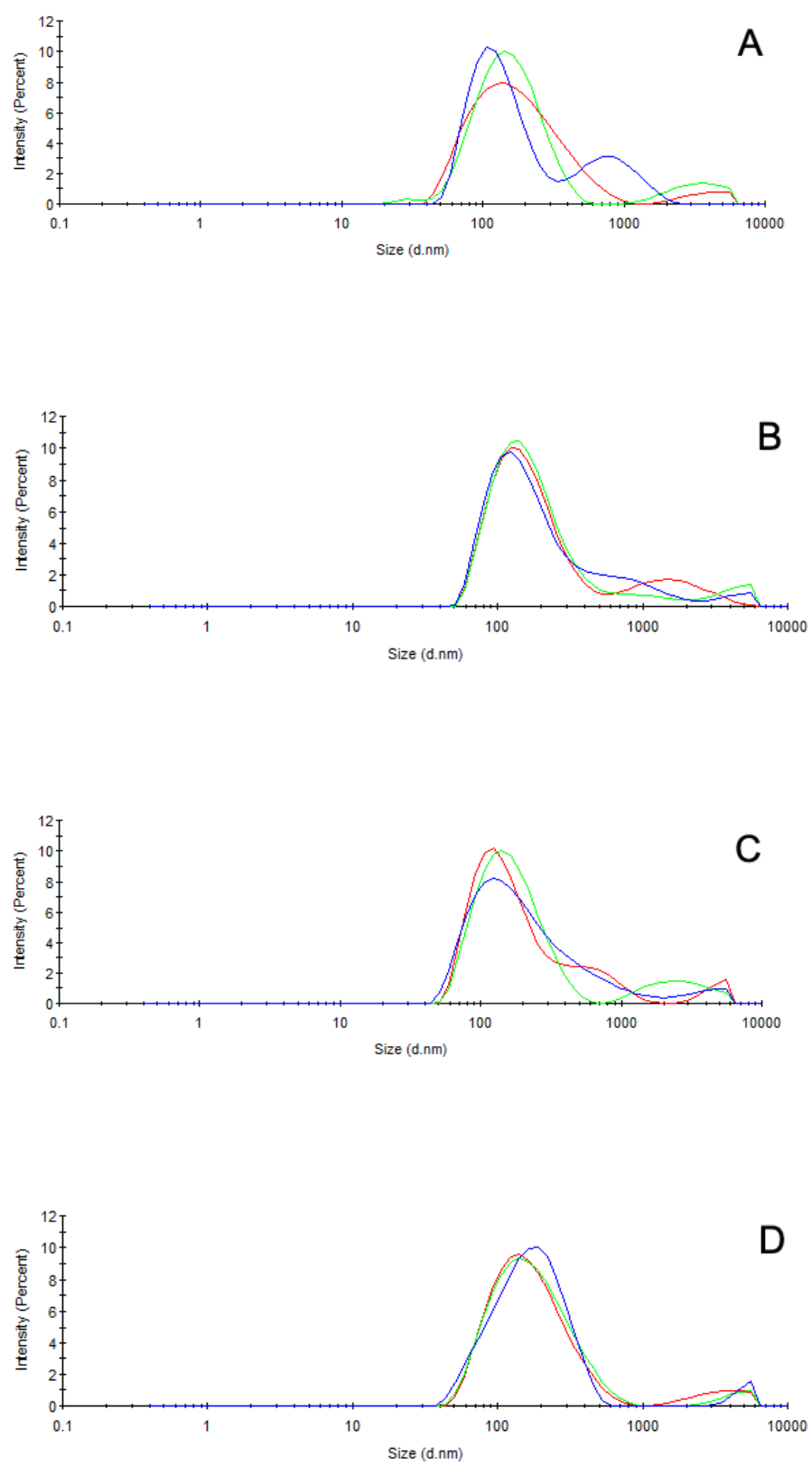
Polissorbato80 (RTO 2) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



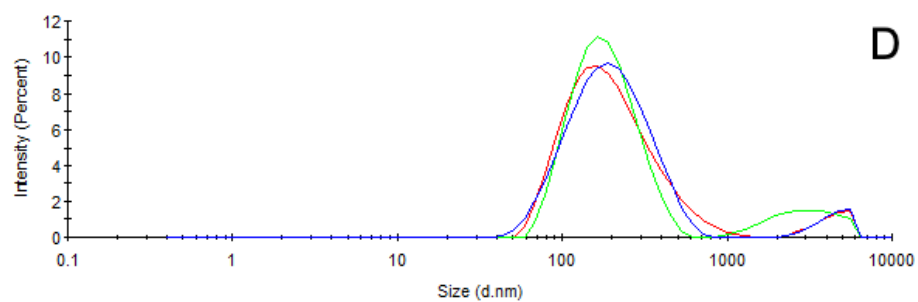
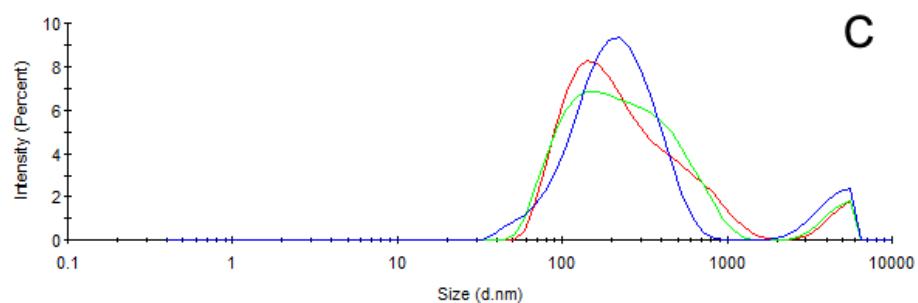
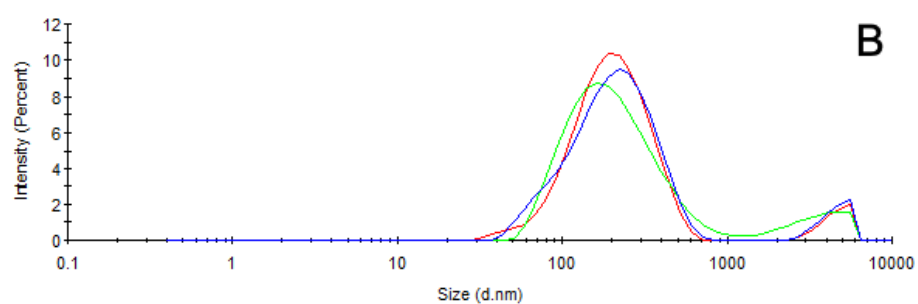
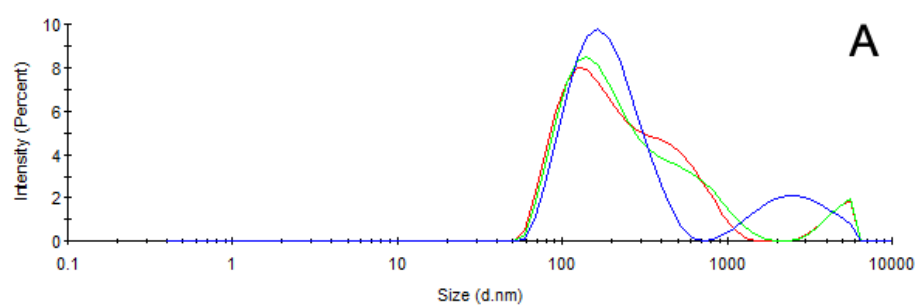
Polissorbato81 (RTO 1) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



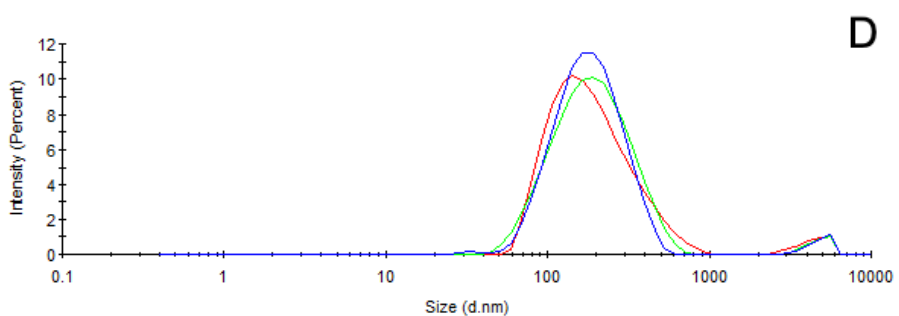
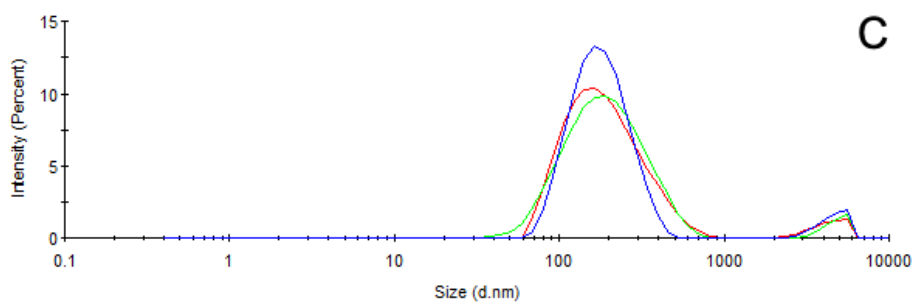
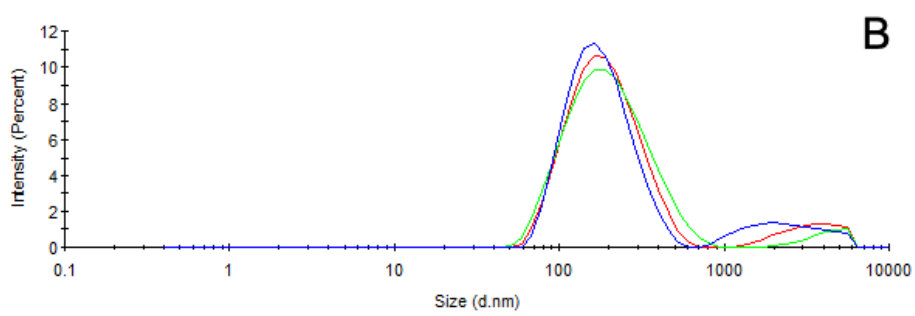
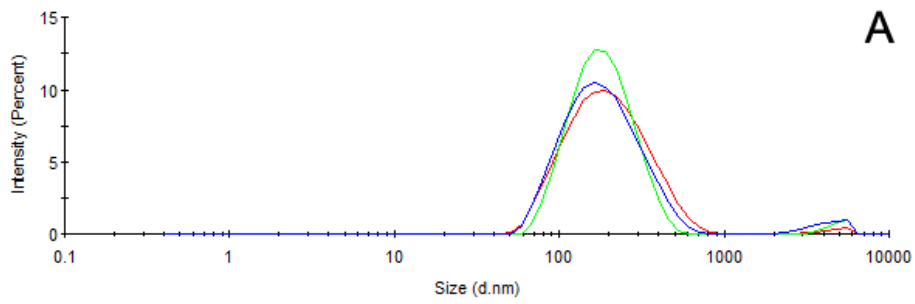
Polissorbato81 (RTO 2) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



Polissorbato85 (RTO 1) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)

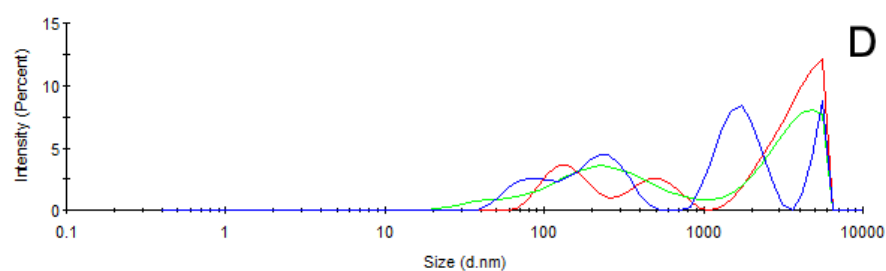
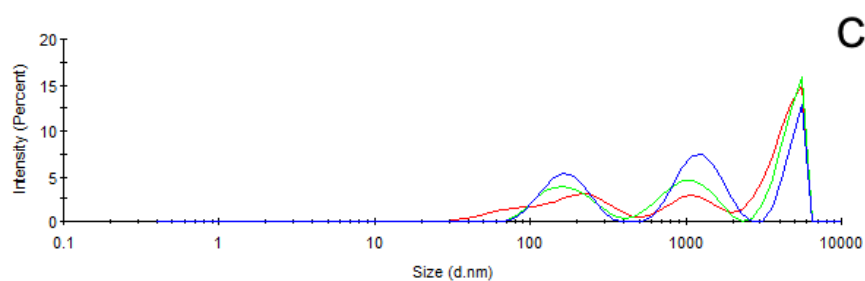
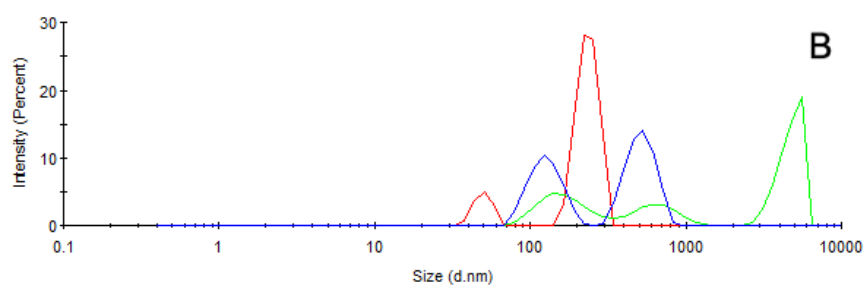
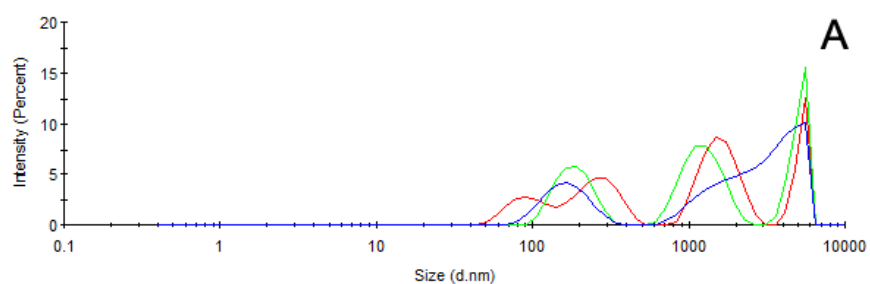


Polissorbato85 (RTO 2) – A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)

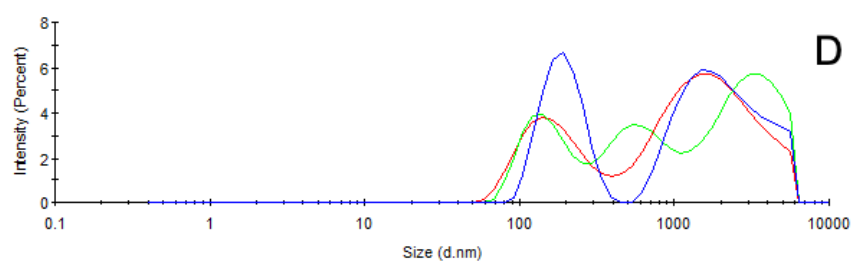
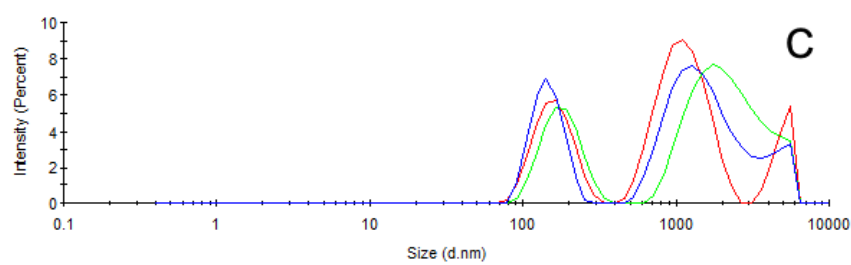
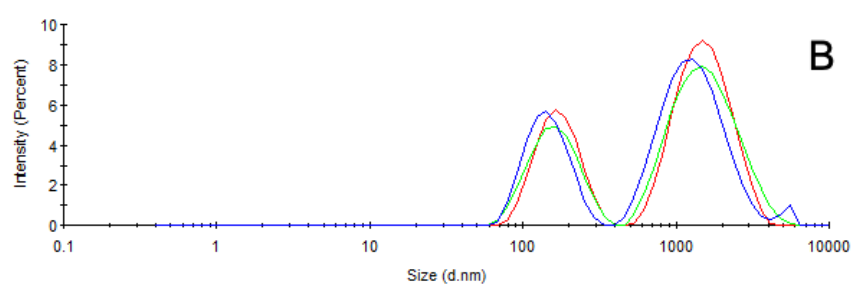
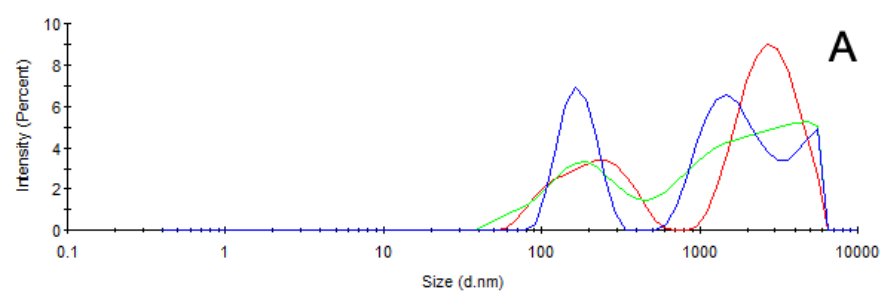


Anexo II - Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações feitas com pares de tensoativos

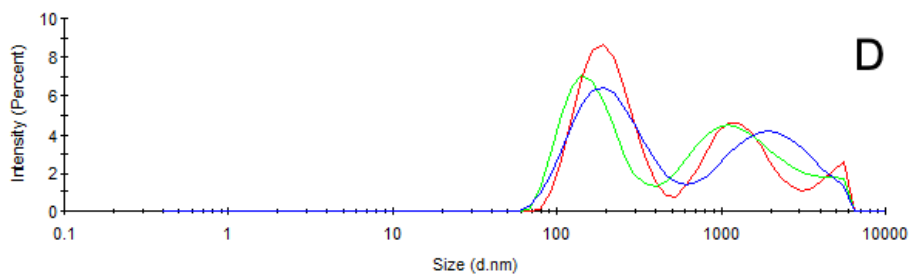
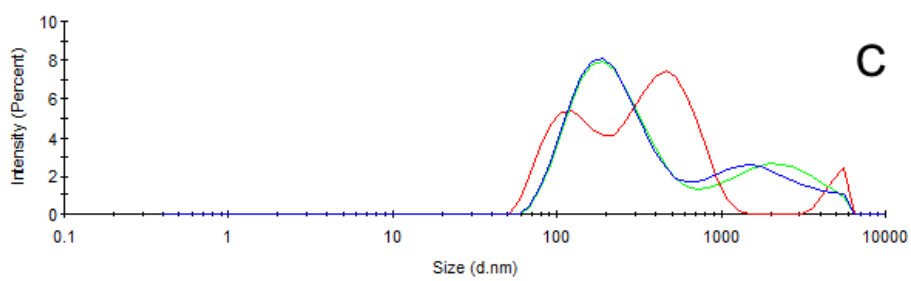
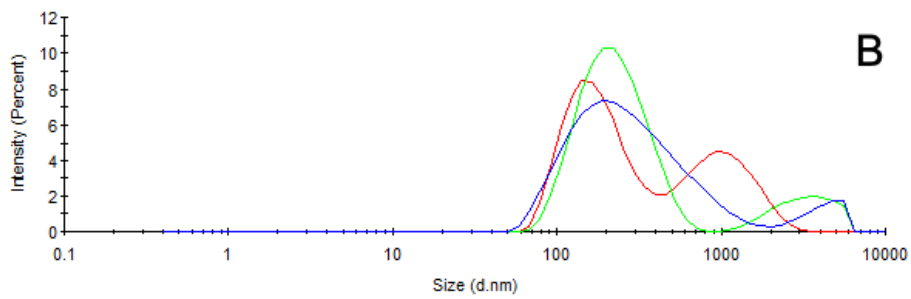
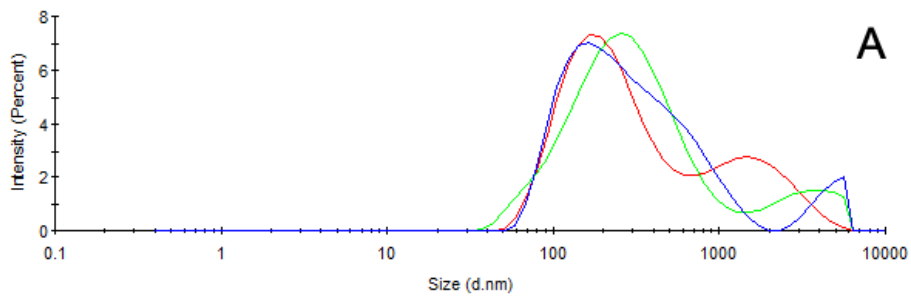
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



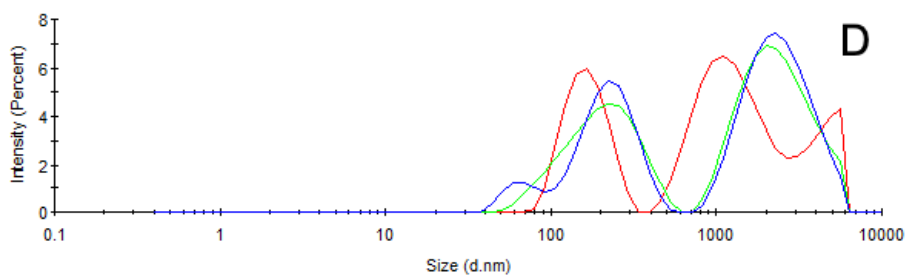
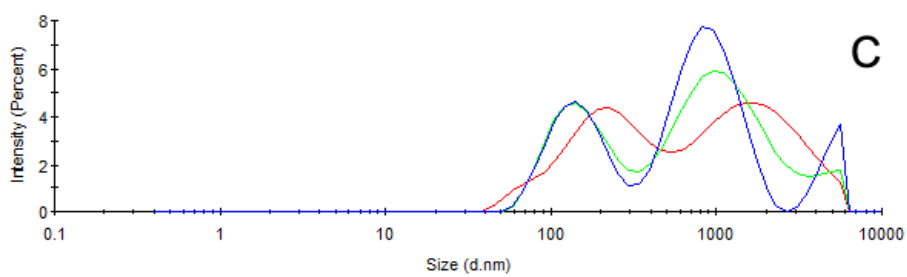
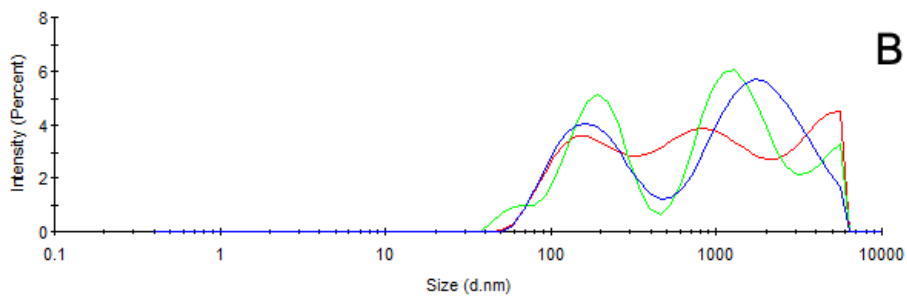
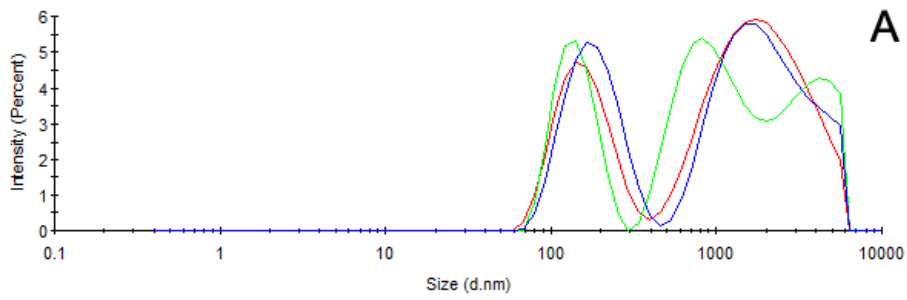
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



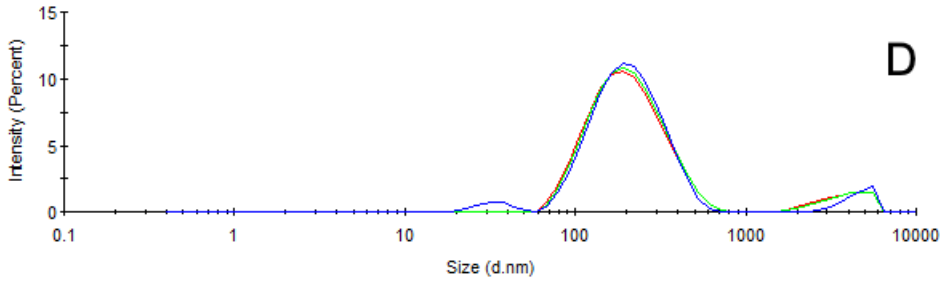
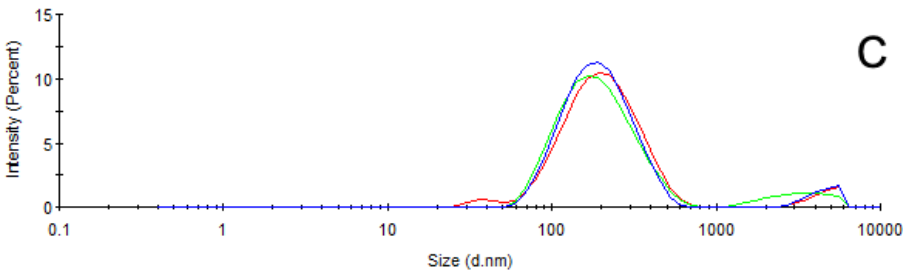
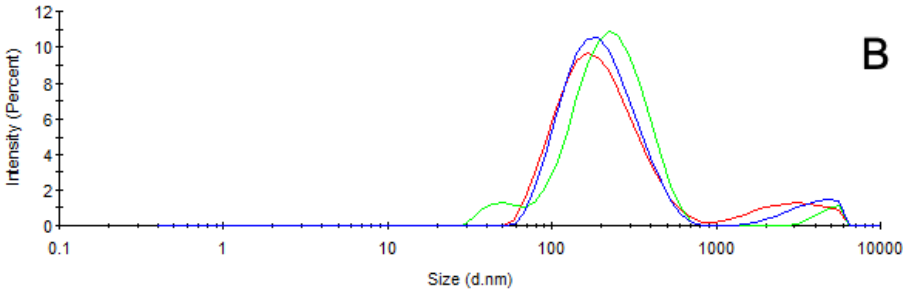
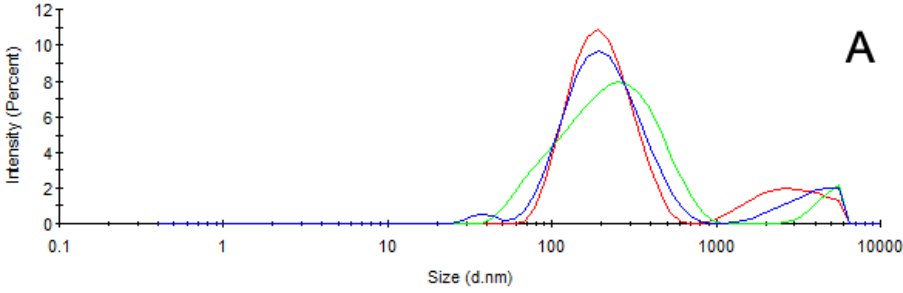
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



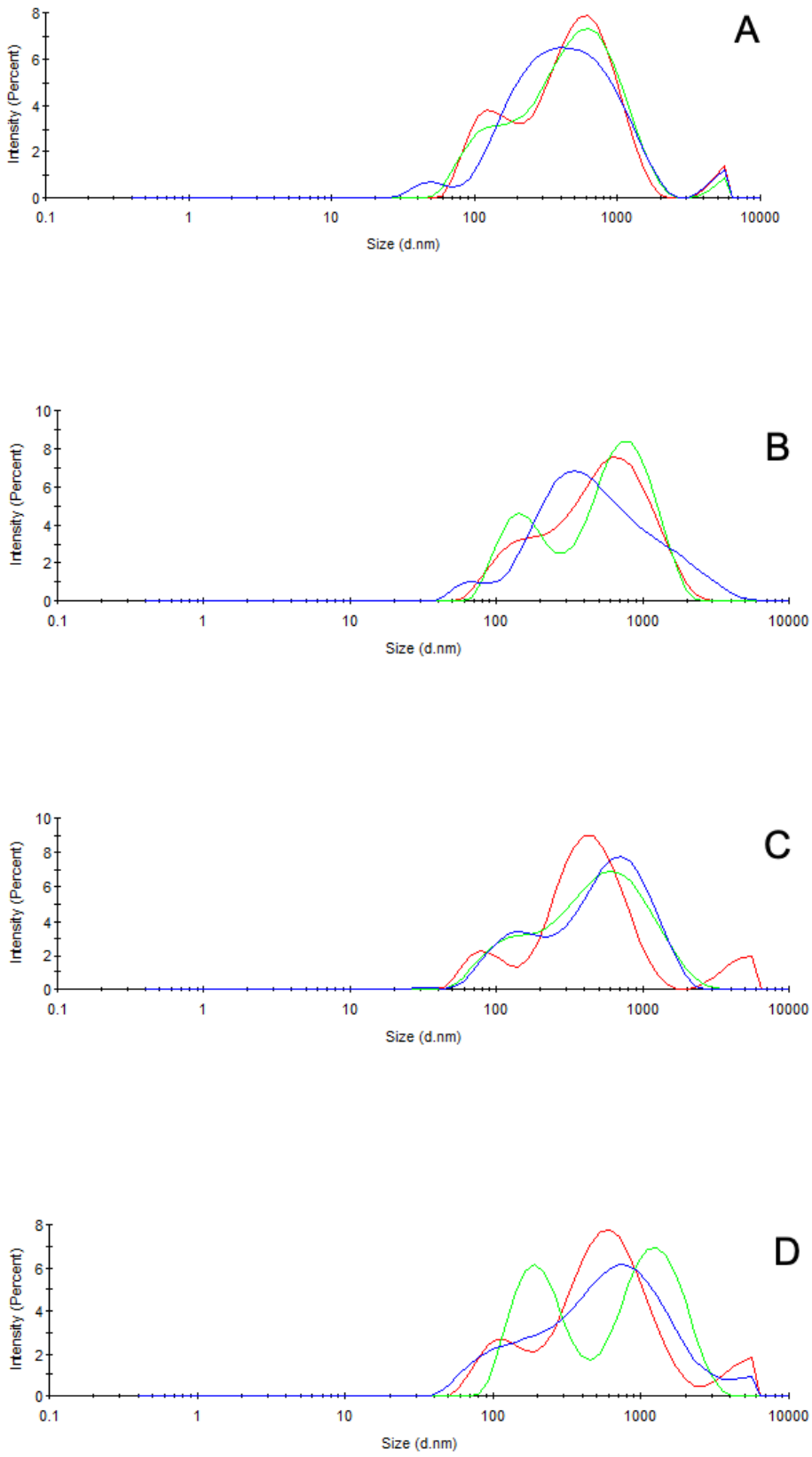
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



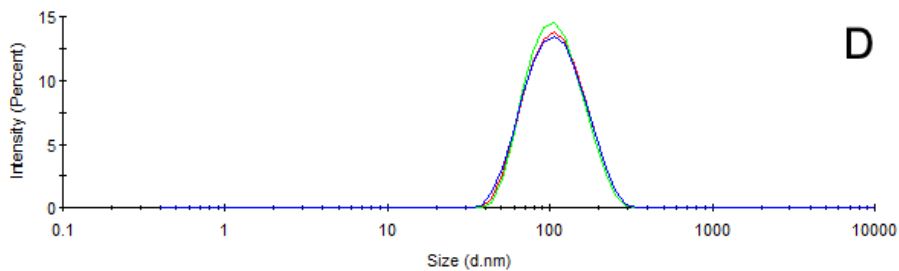
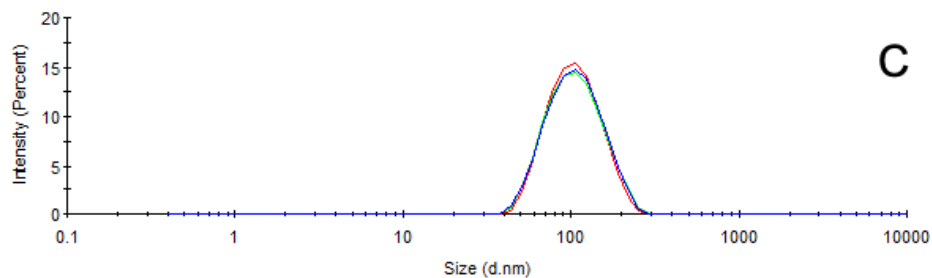
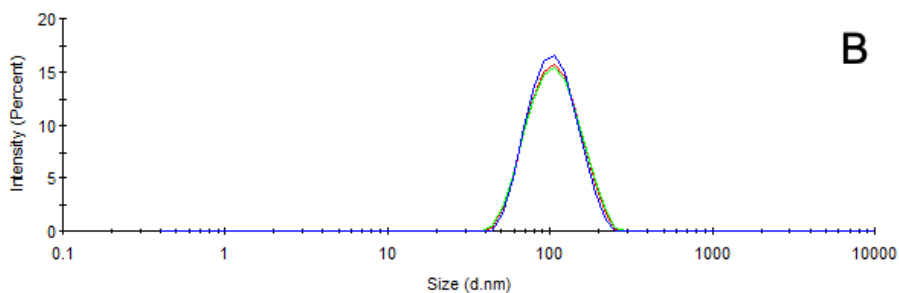
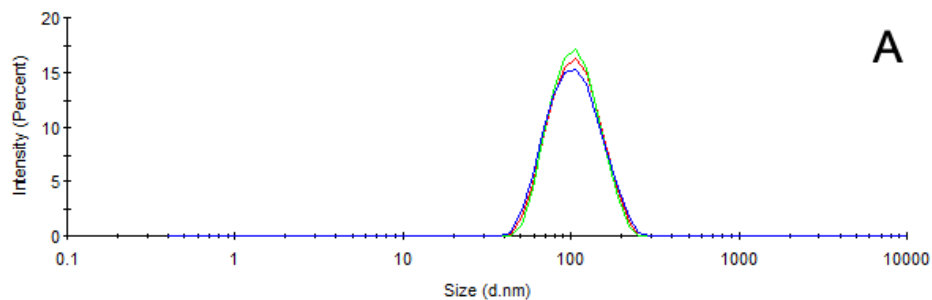
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



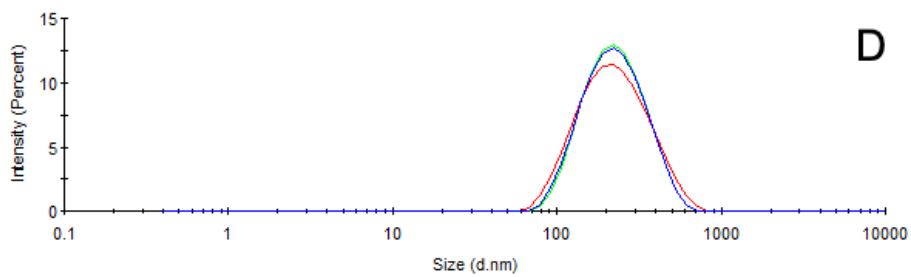
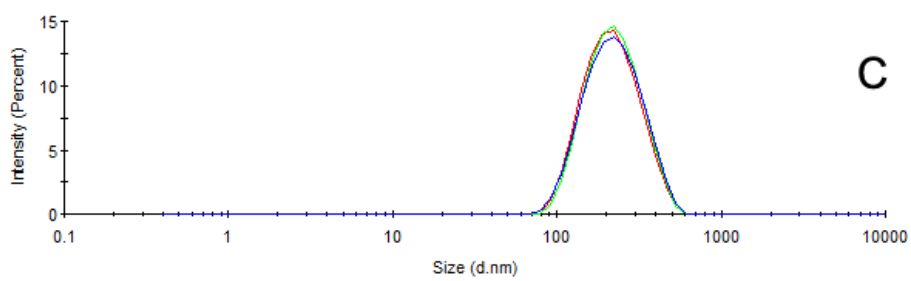
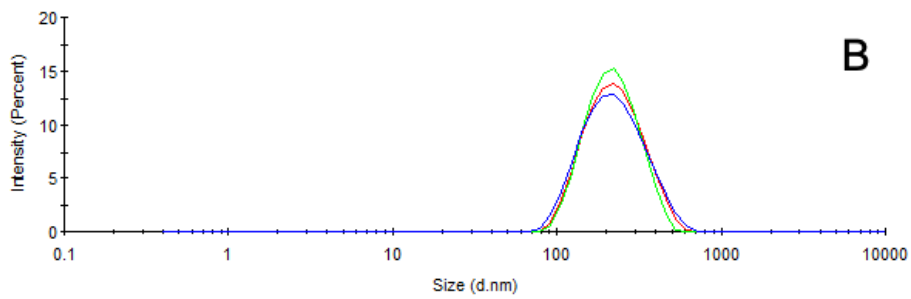
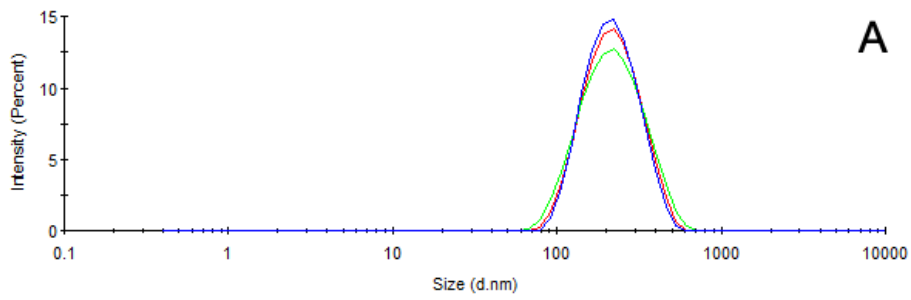
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



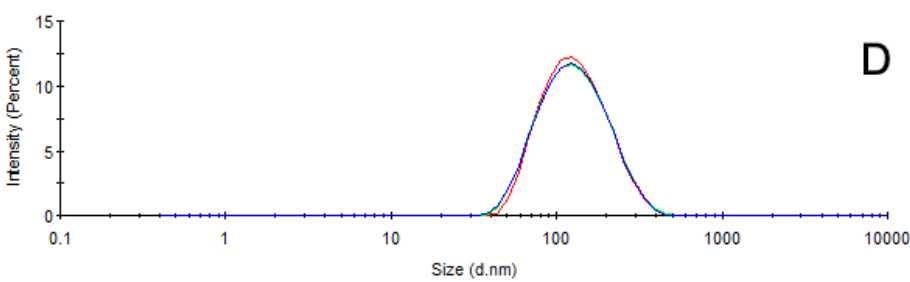
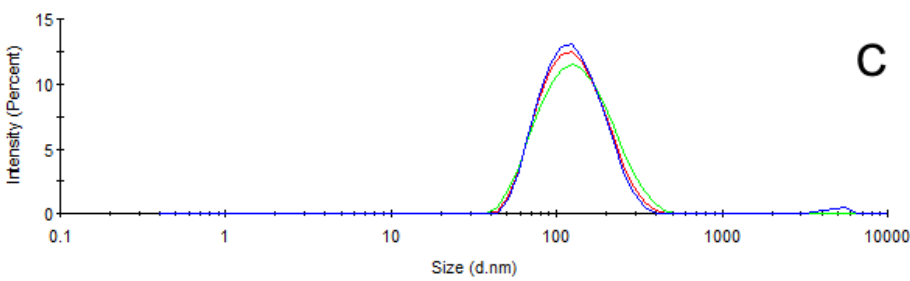
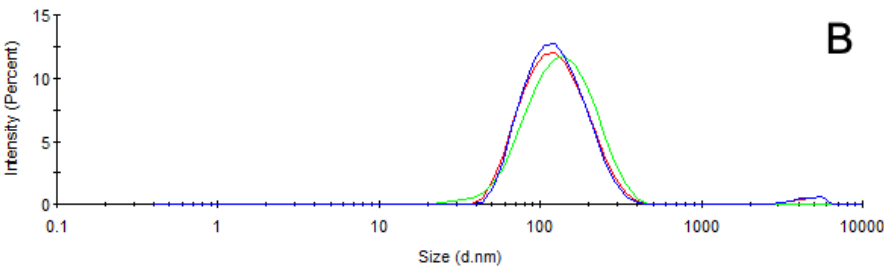
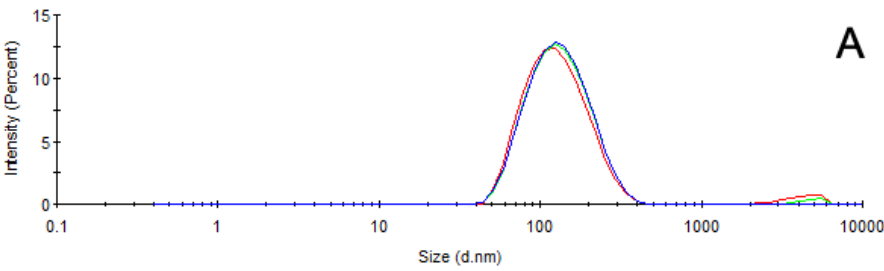
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



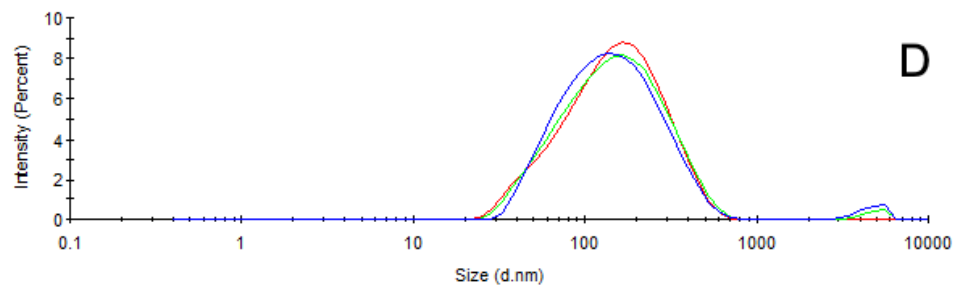
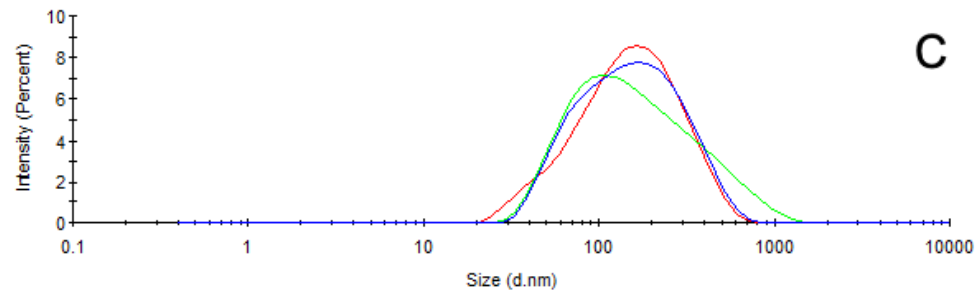
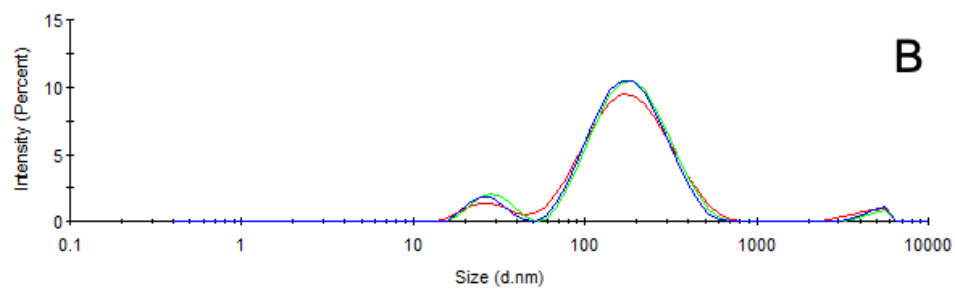
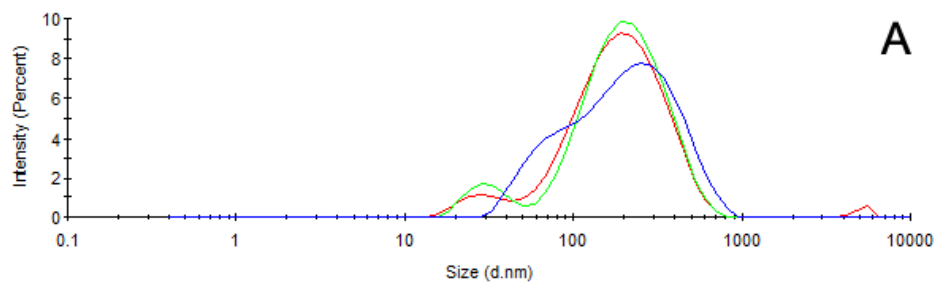
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



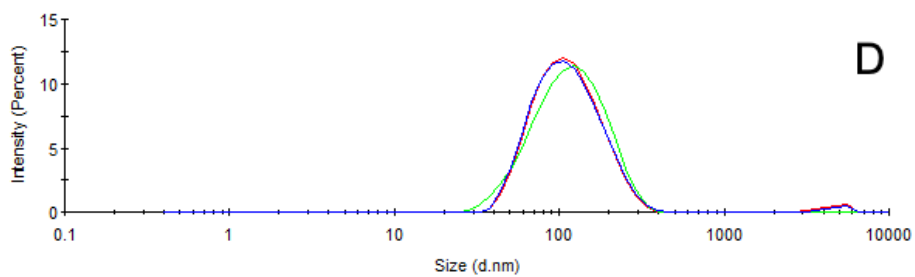
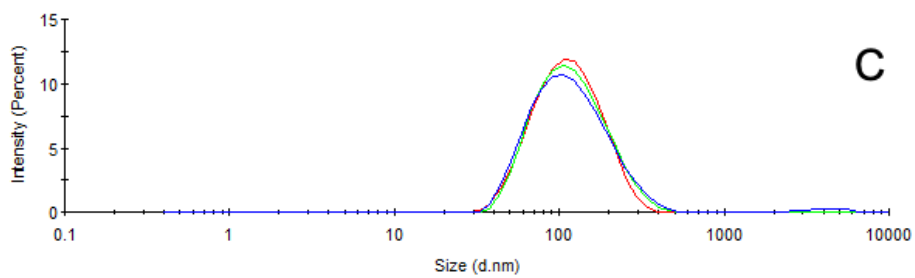
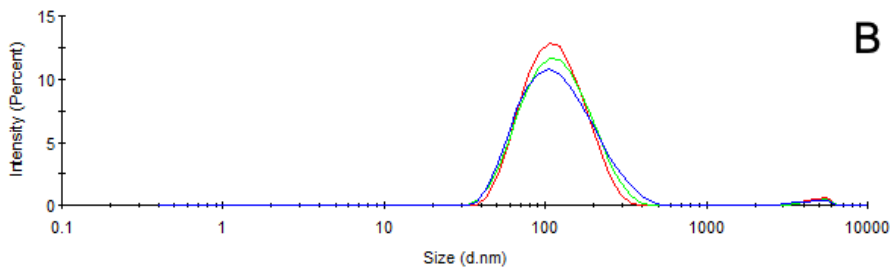
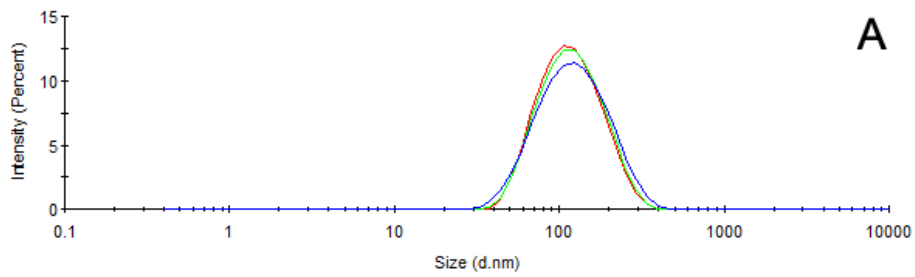
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



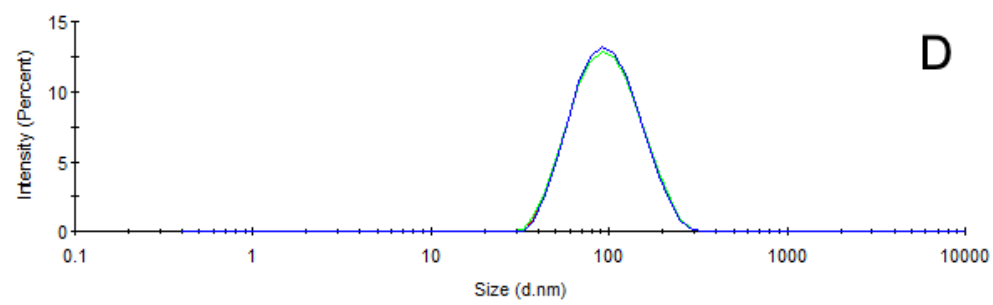
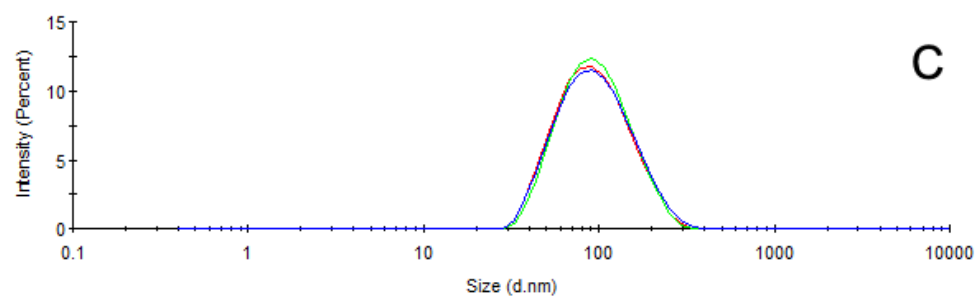
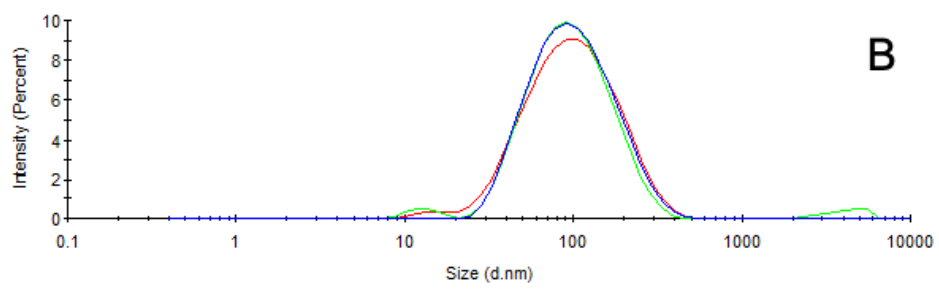
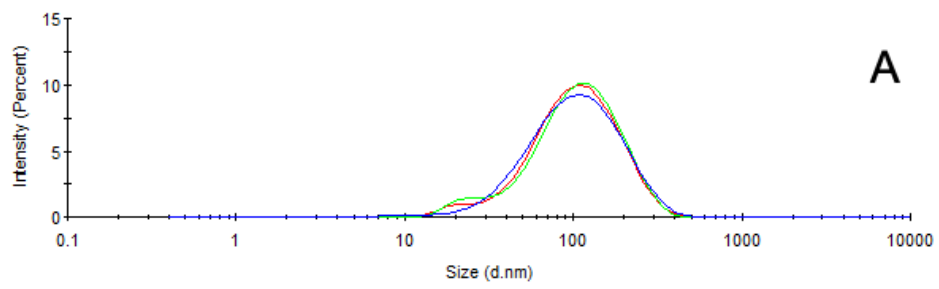
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



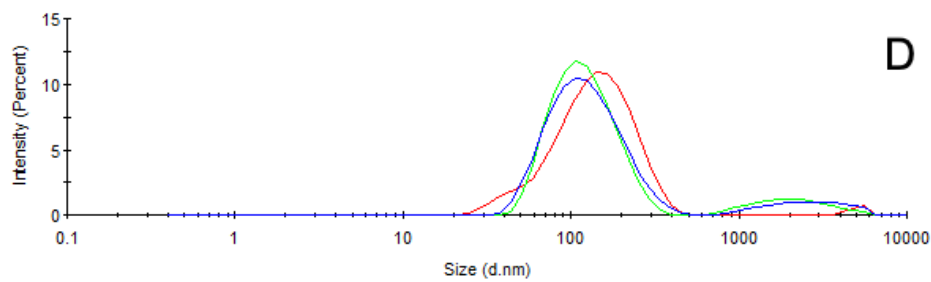
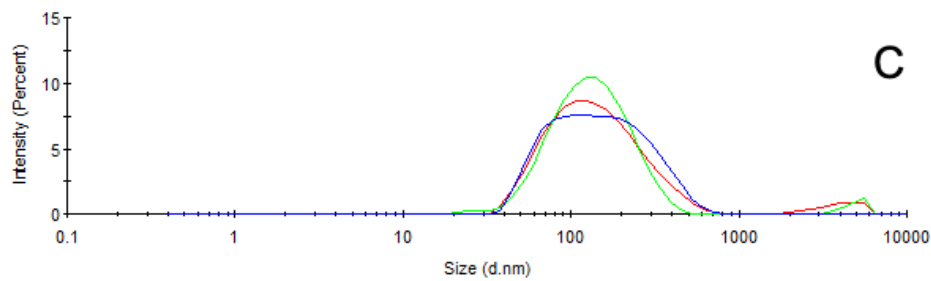
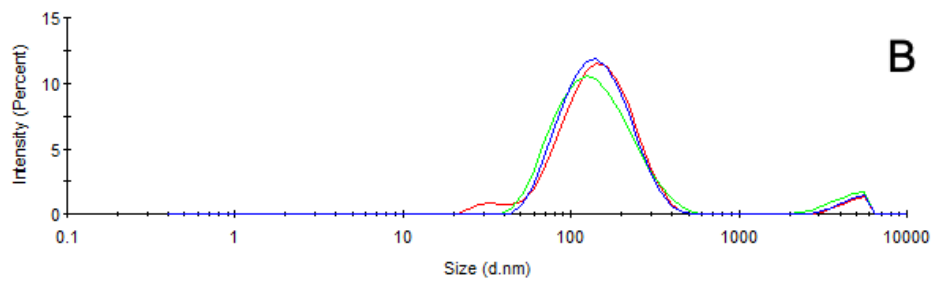
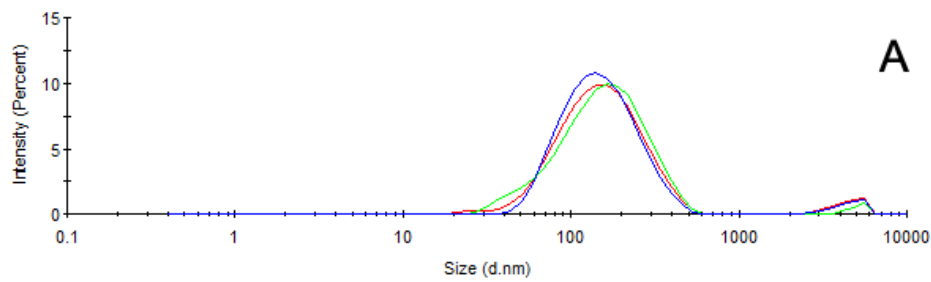
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 15– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



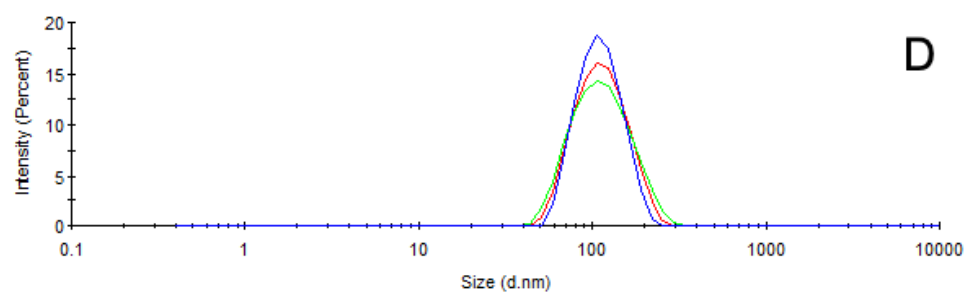
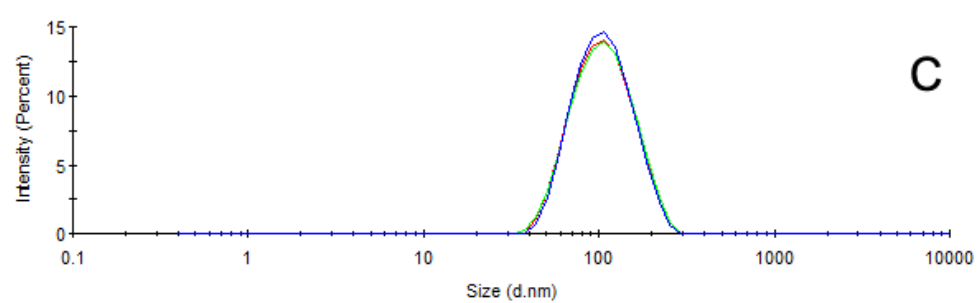
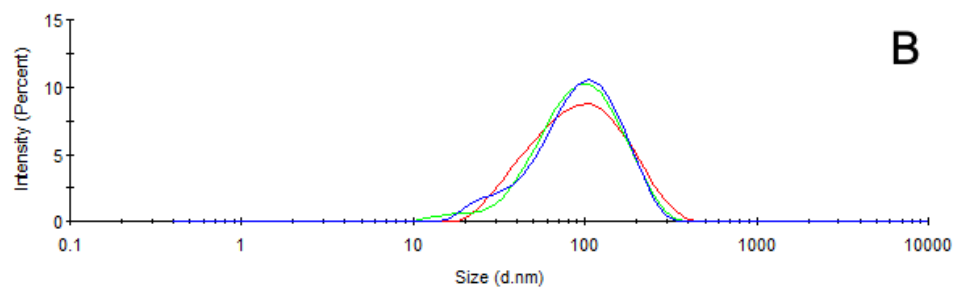
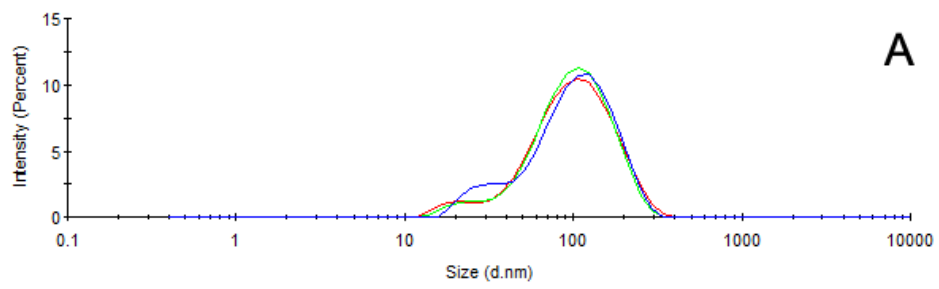
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 15– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



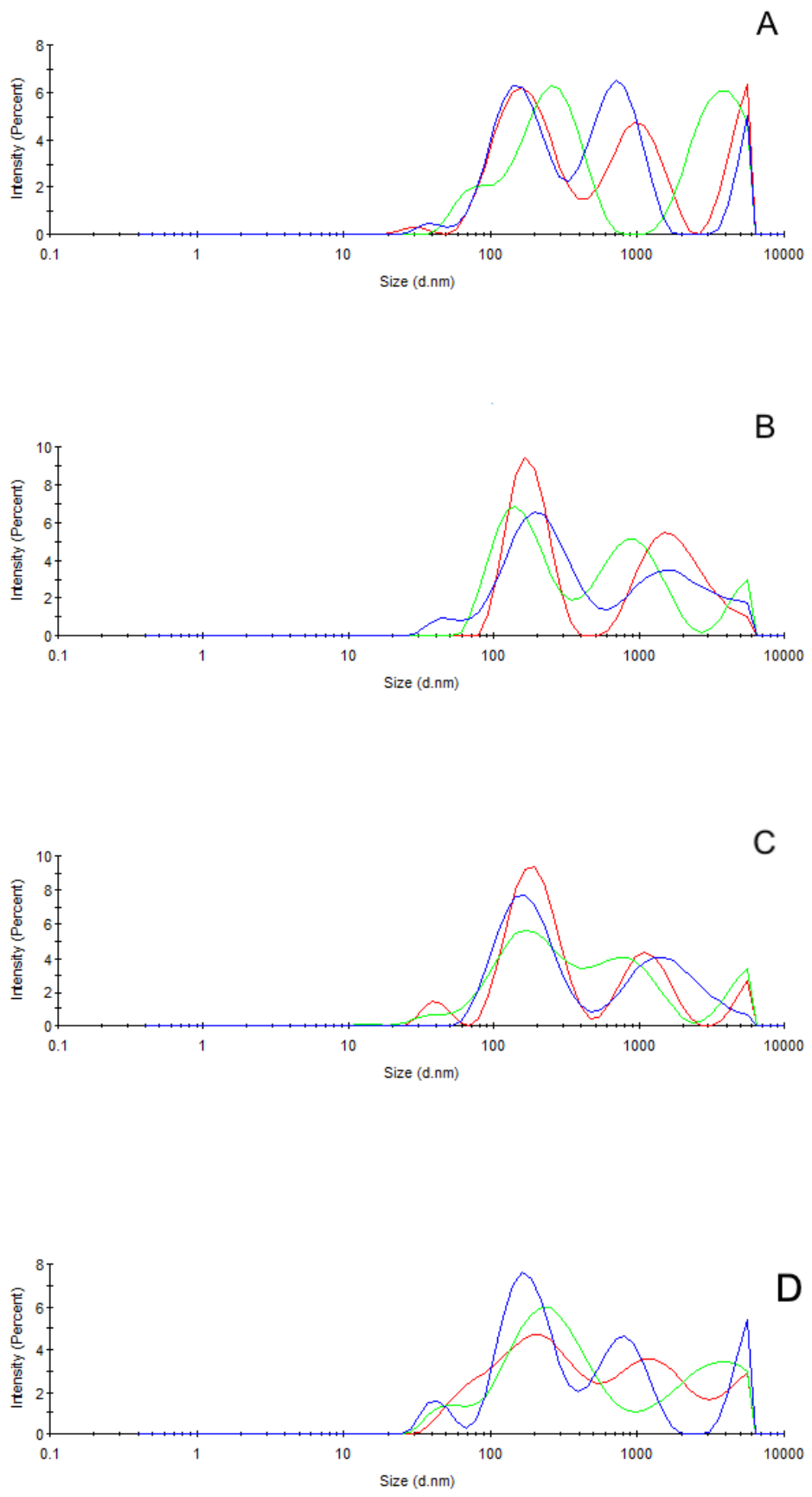
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 1) EHL 16– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



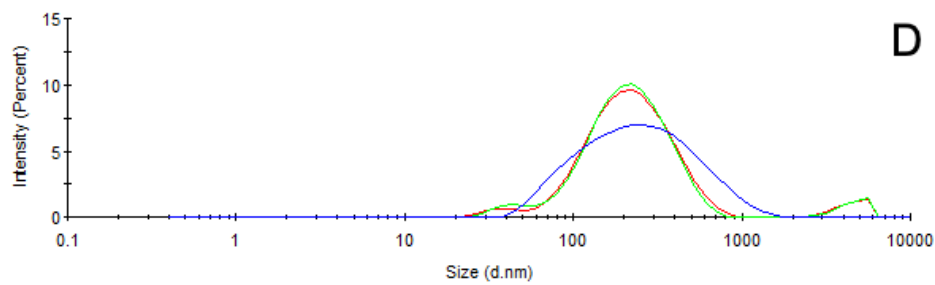
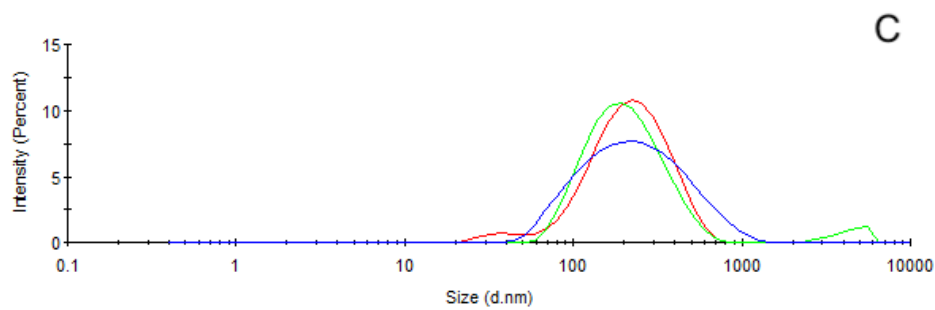
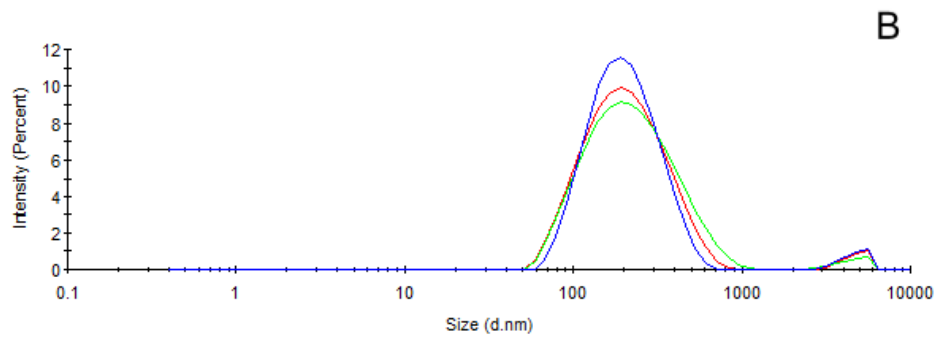
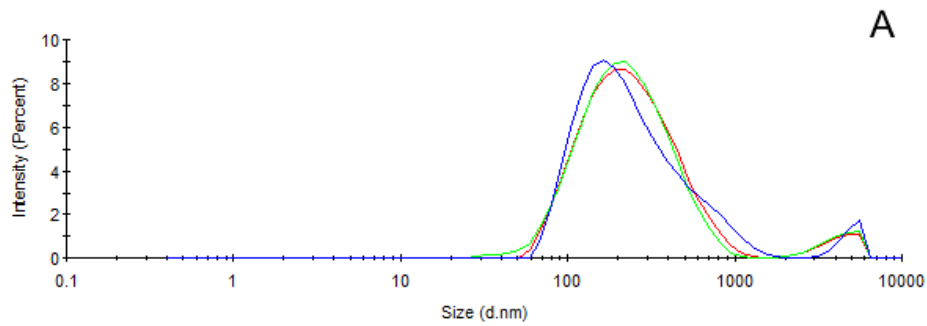
Polissorbato 20/Monooleato de sorbitano (RTO 2) EHL 16– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



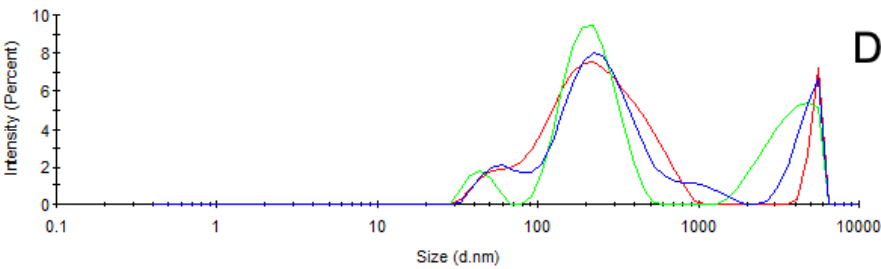
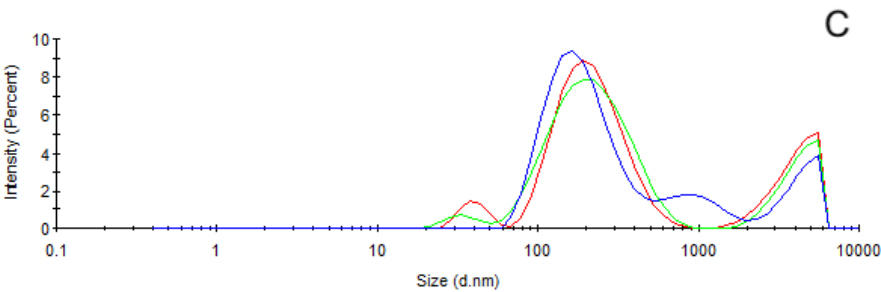
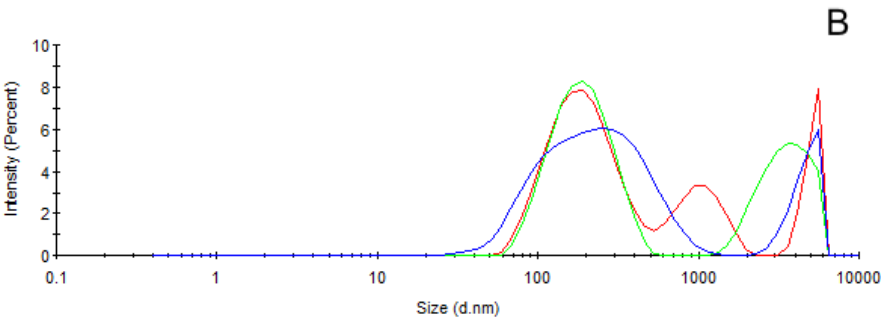
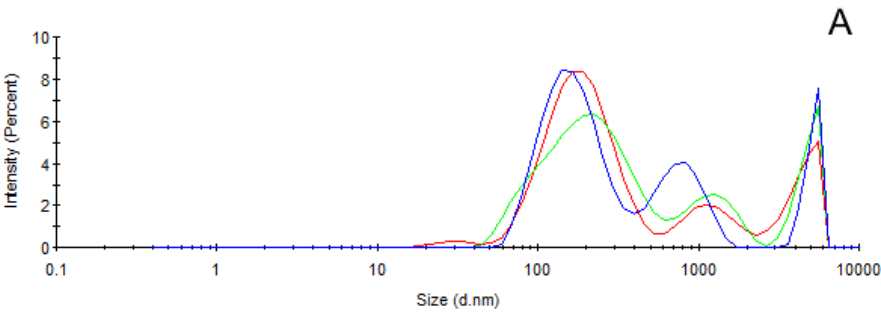
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



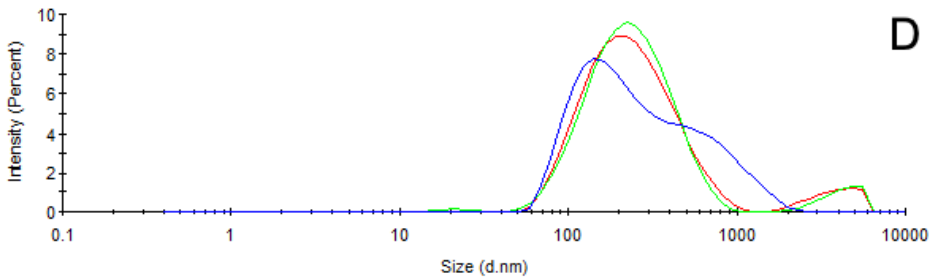
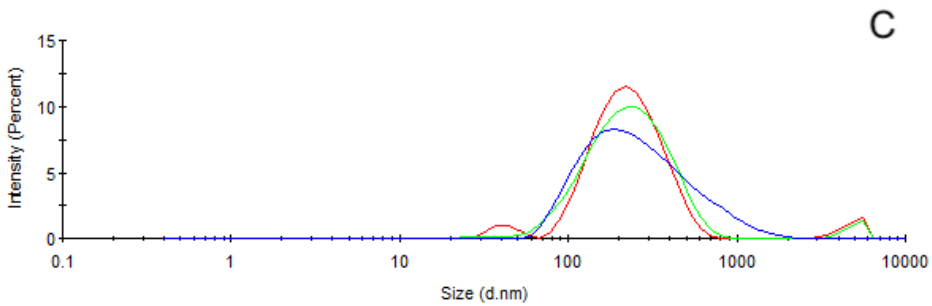
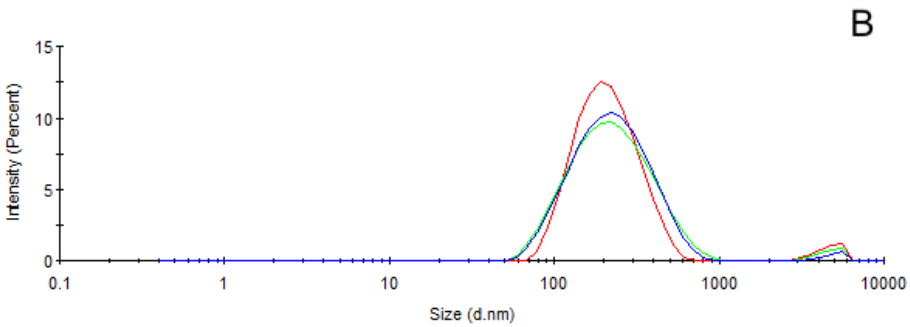
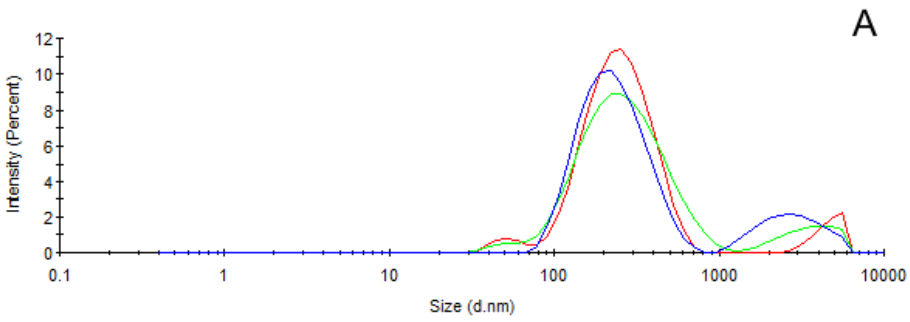
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



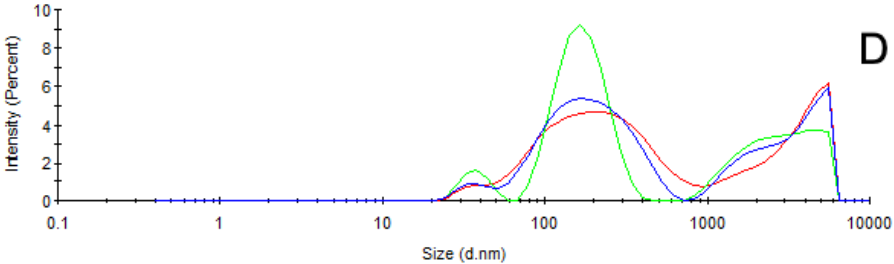
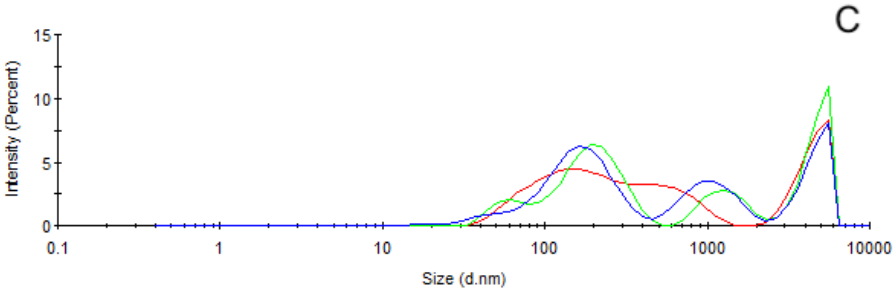
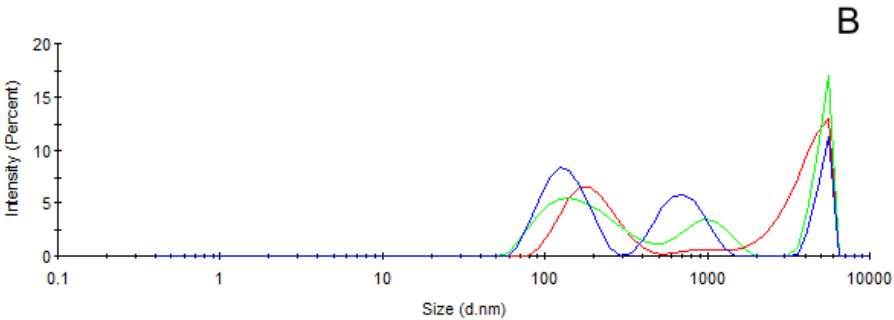
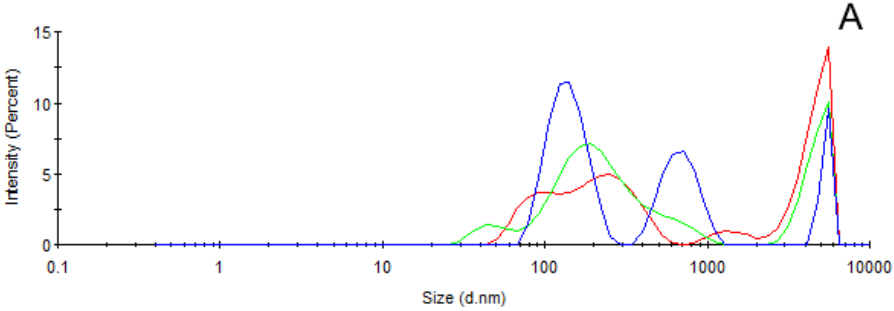
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



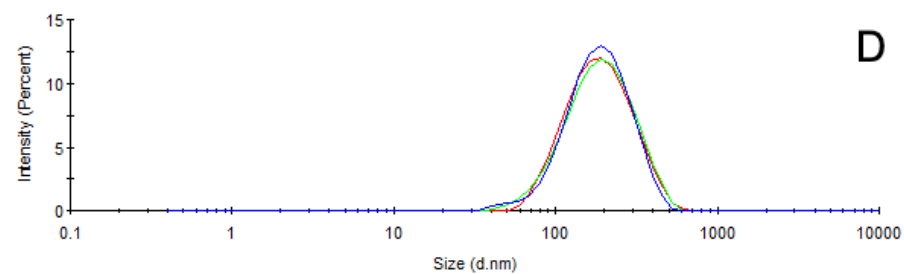
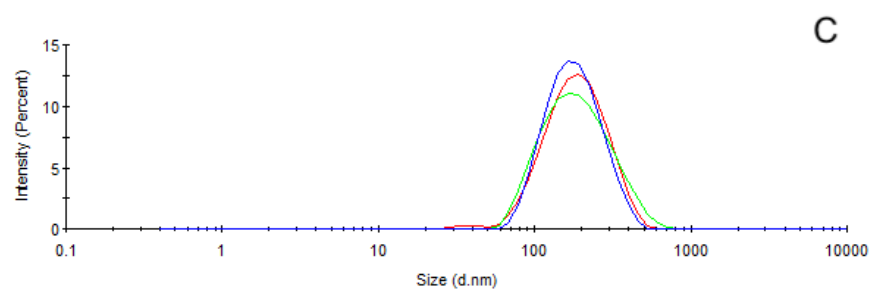
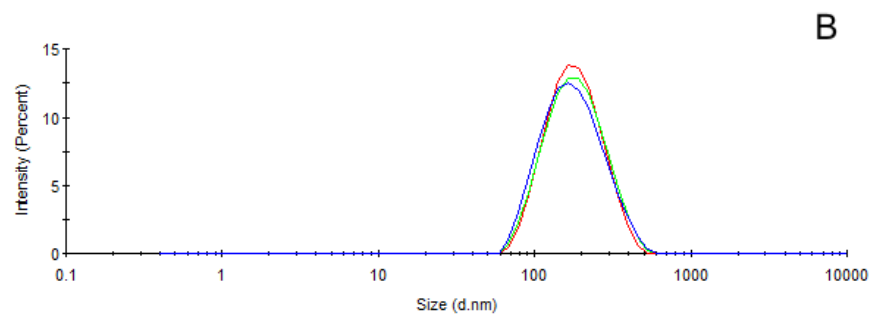
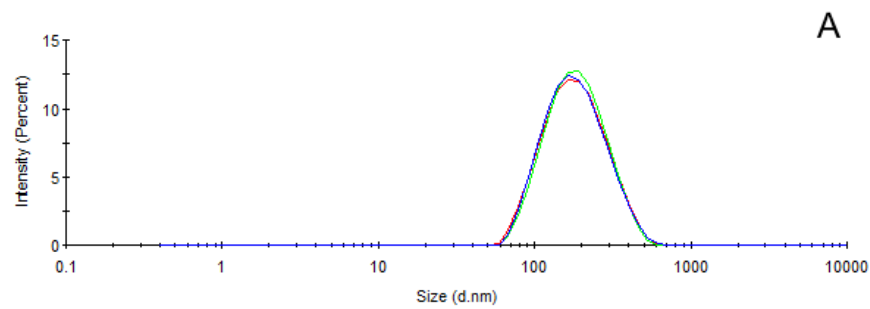
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



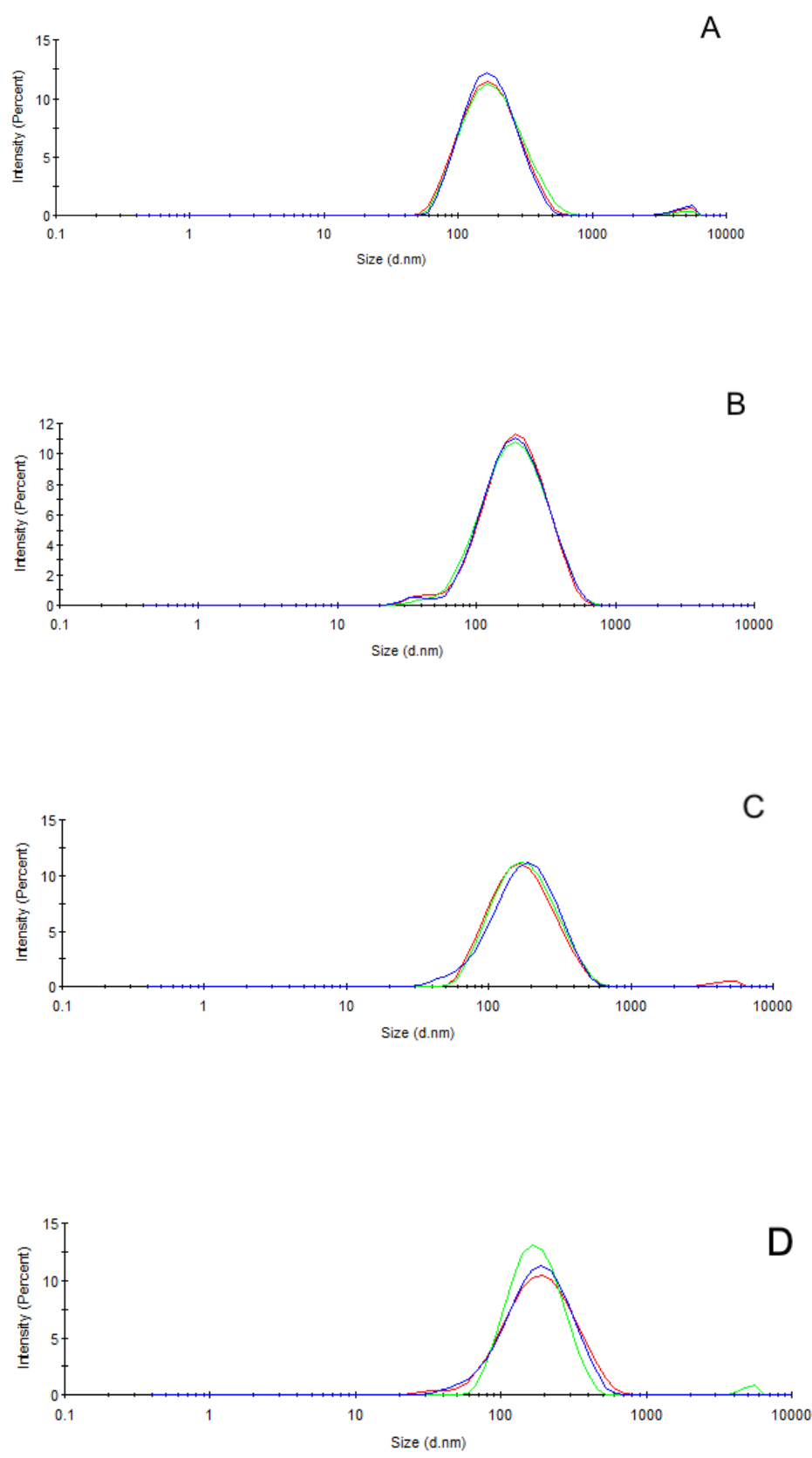
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



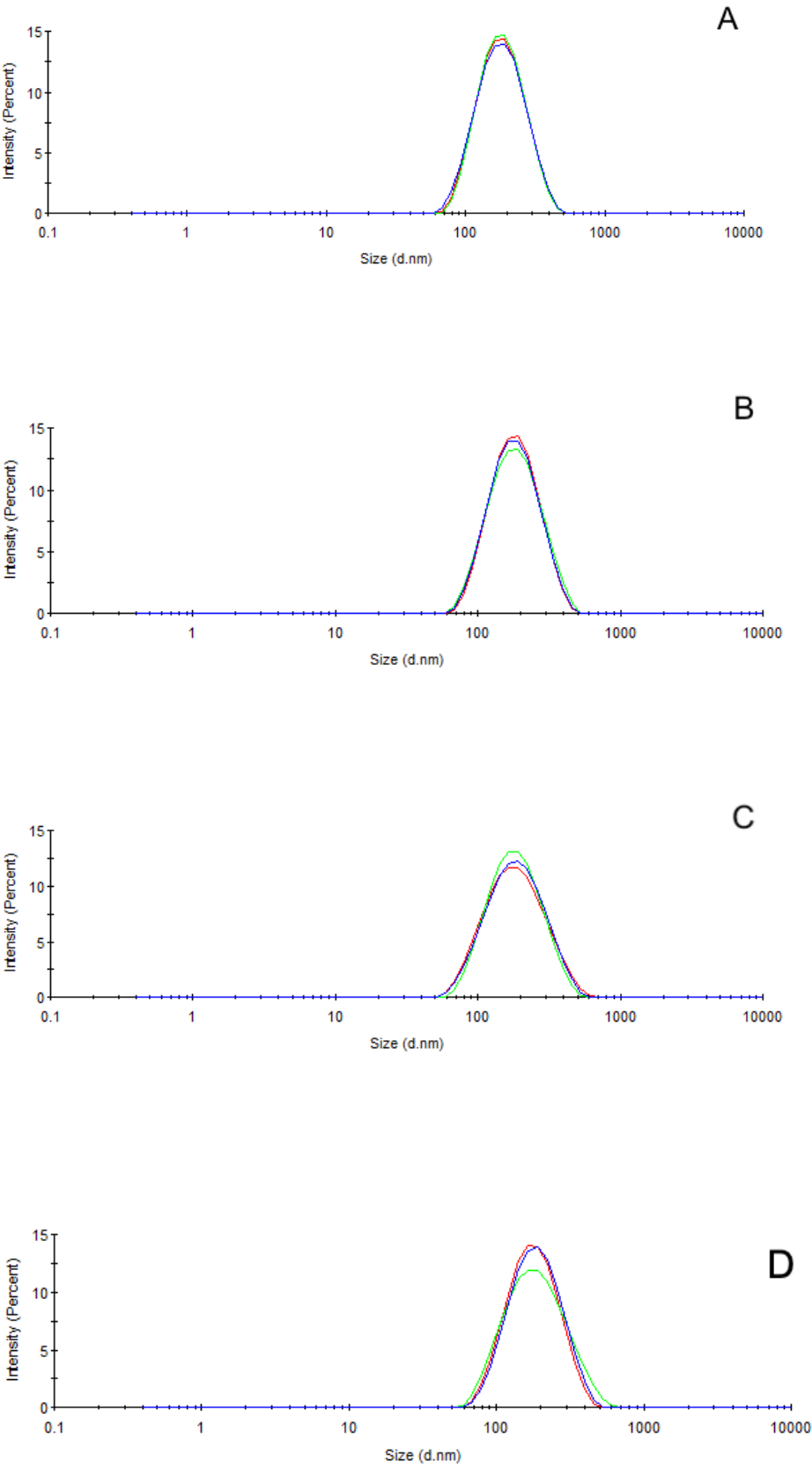
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



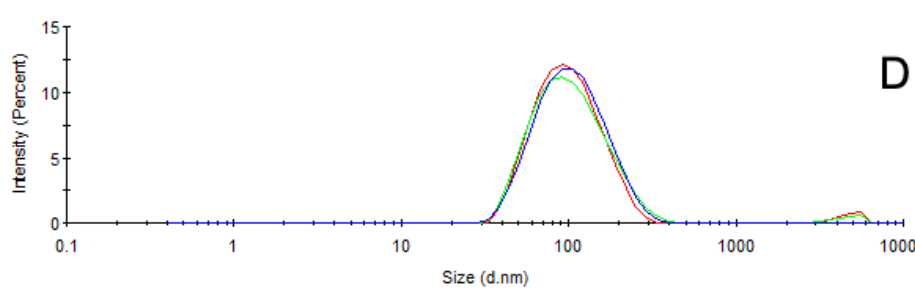
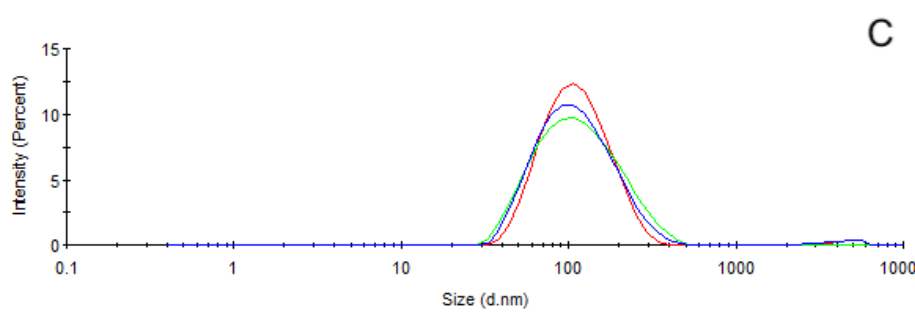
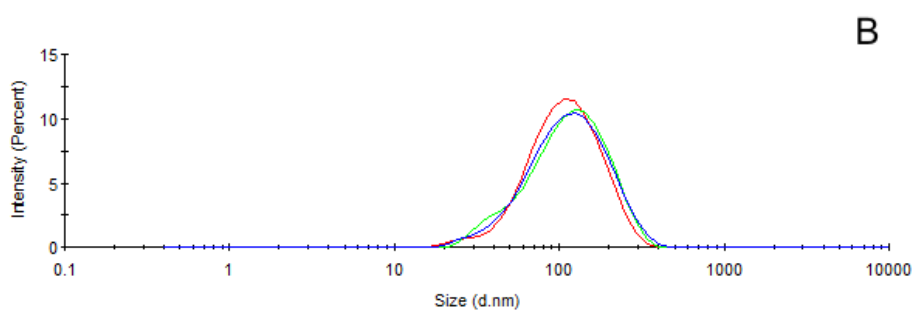
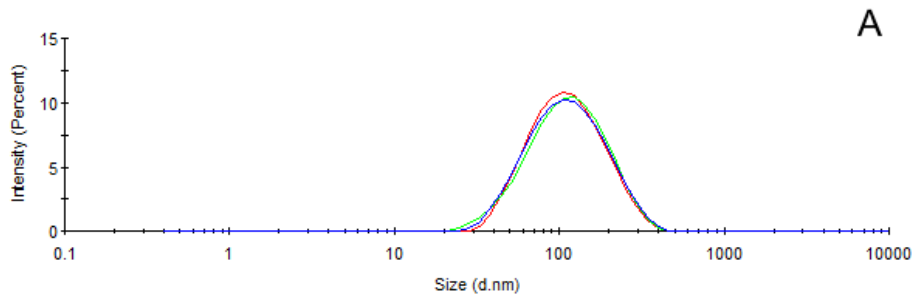
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



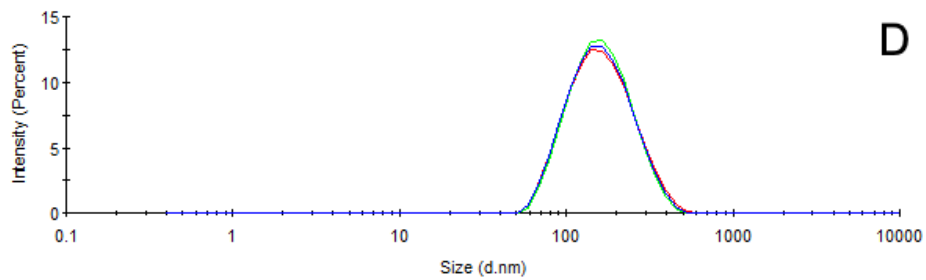
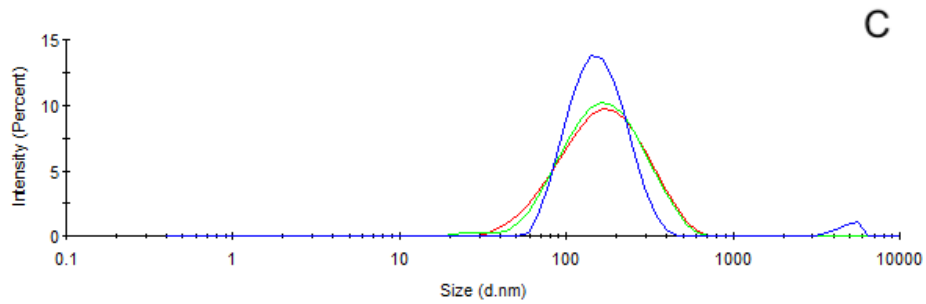
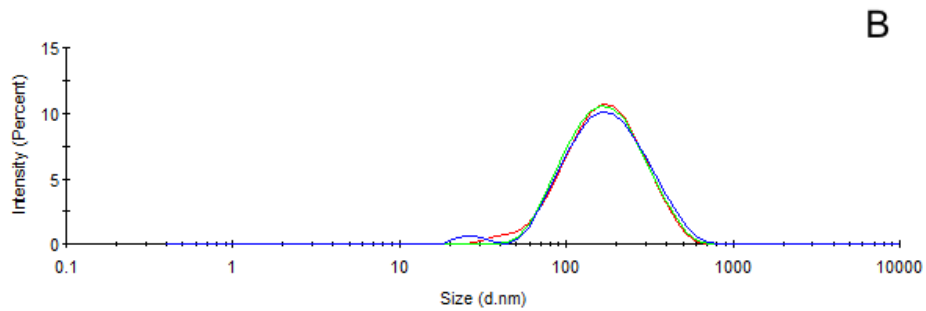
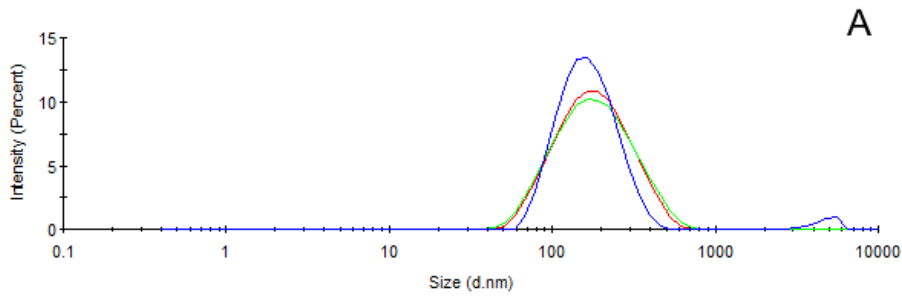
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



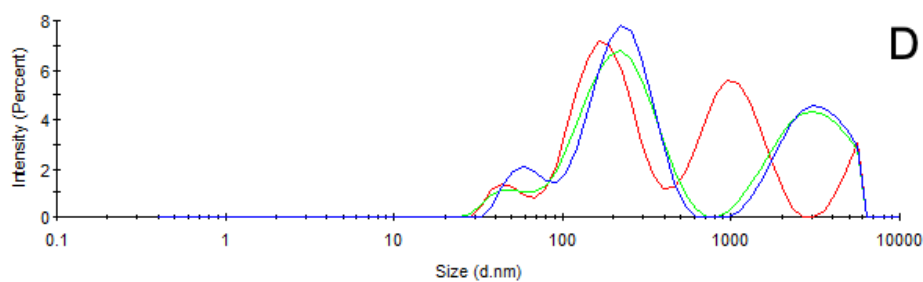
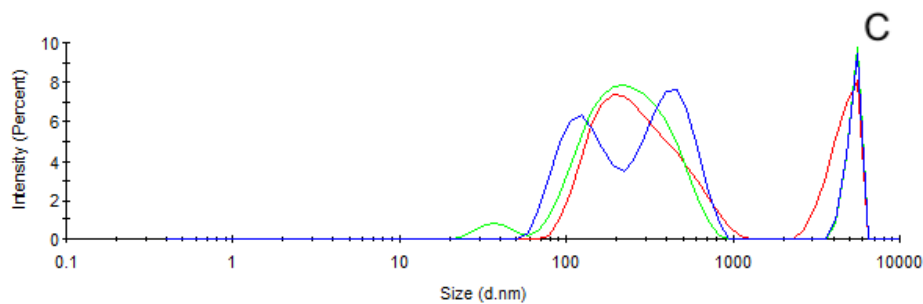
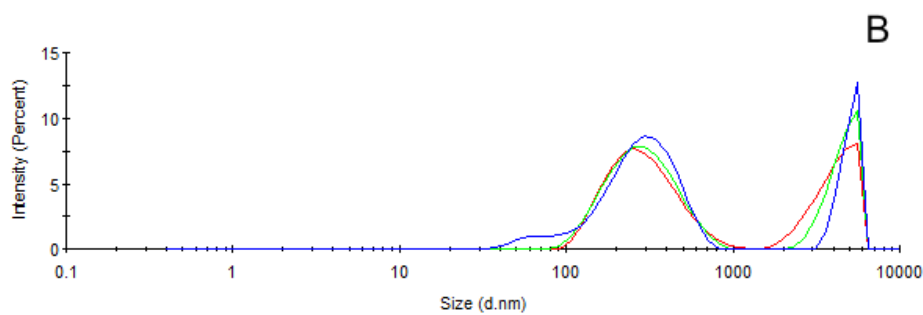
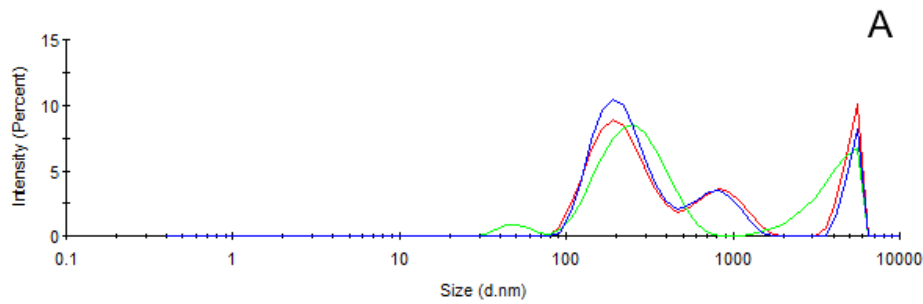
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



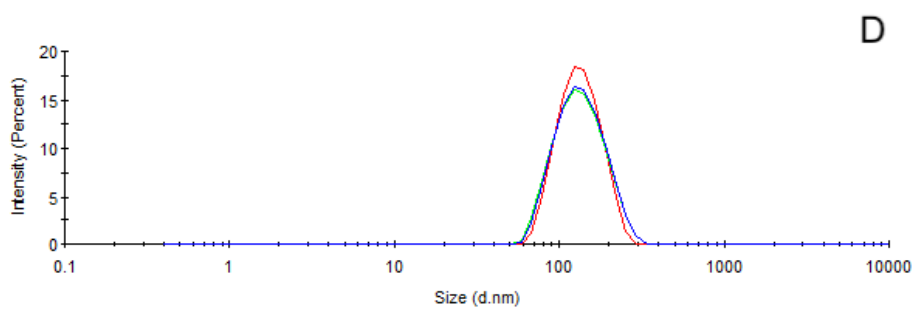
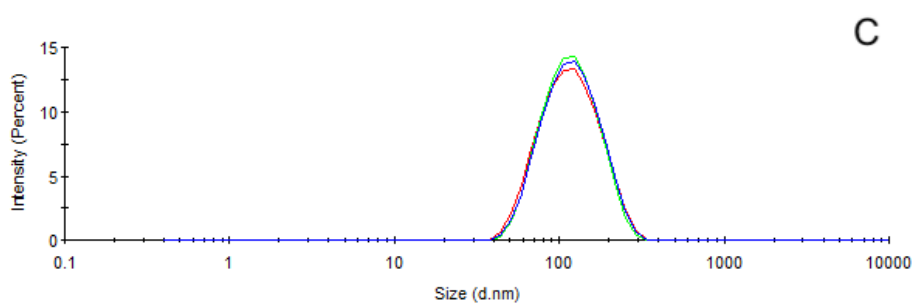
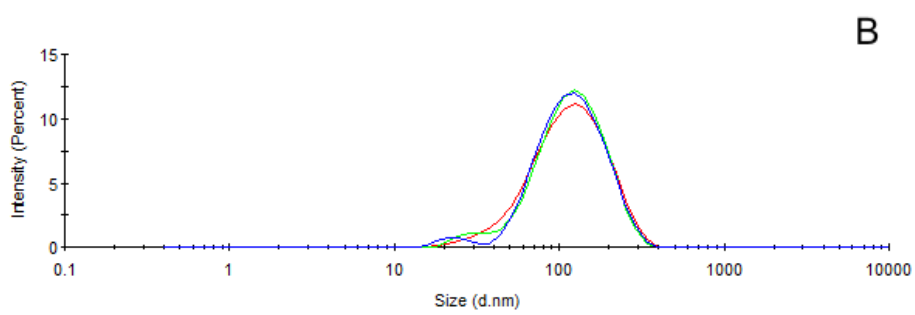
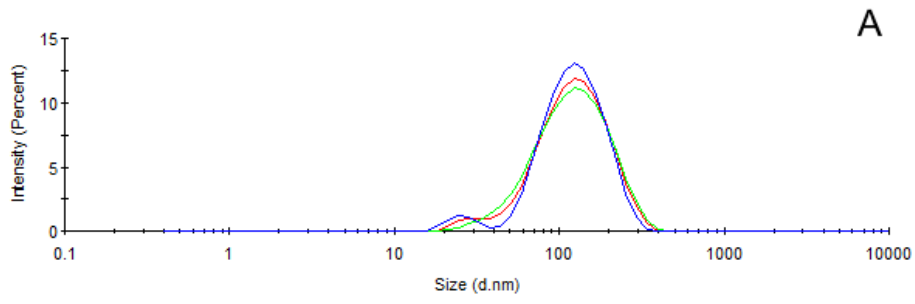
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



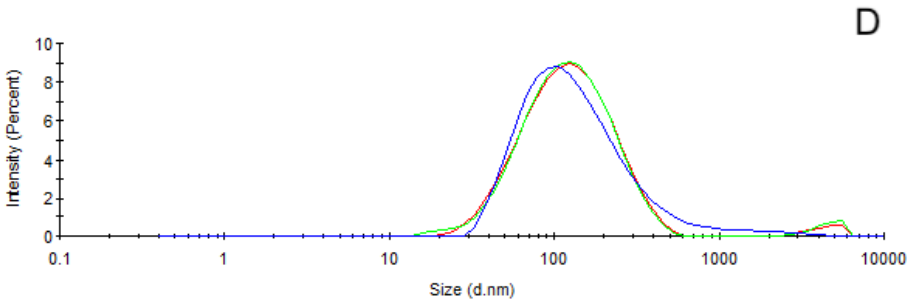
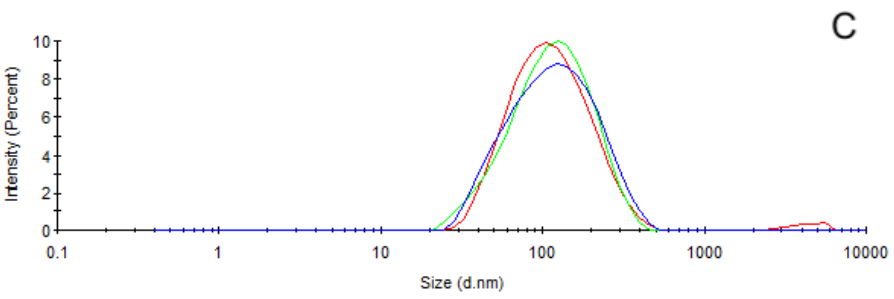
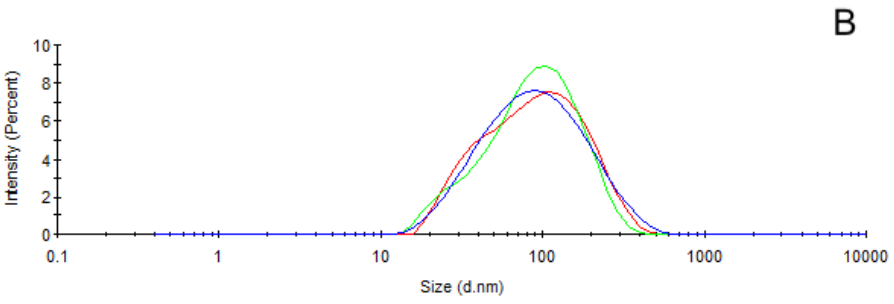
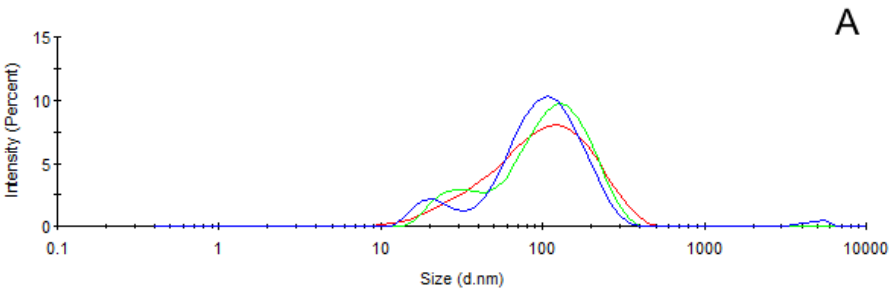
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 15– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



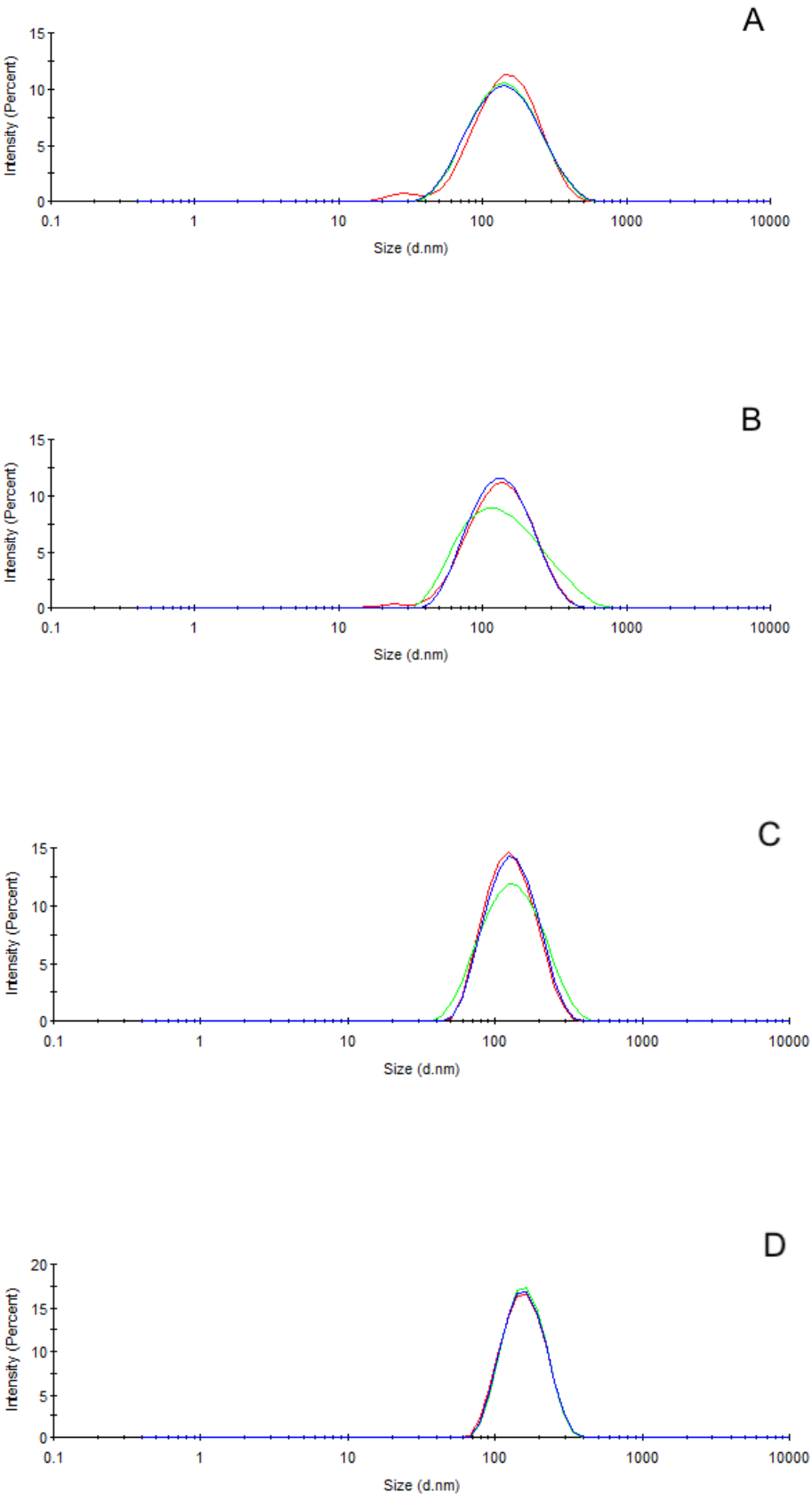
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 15– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



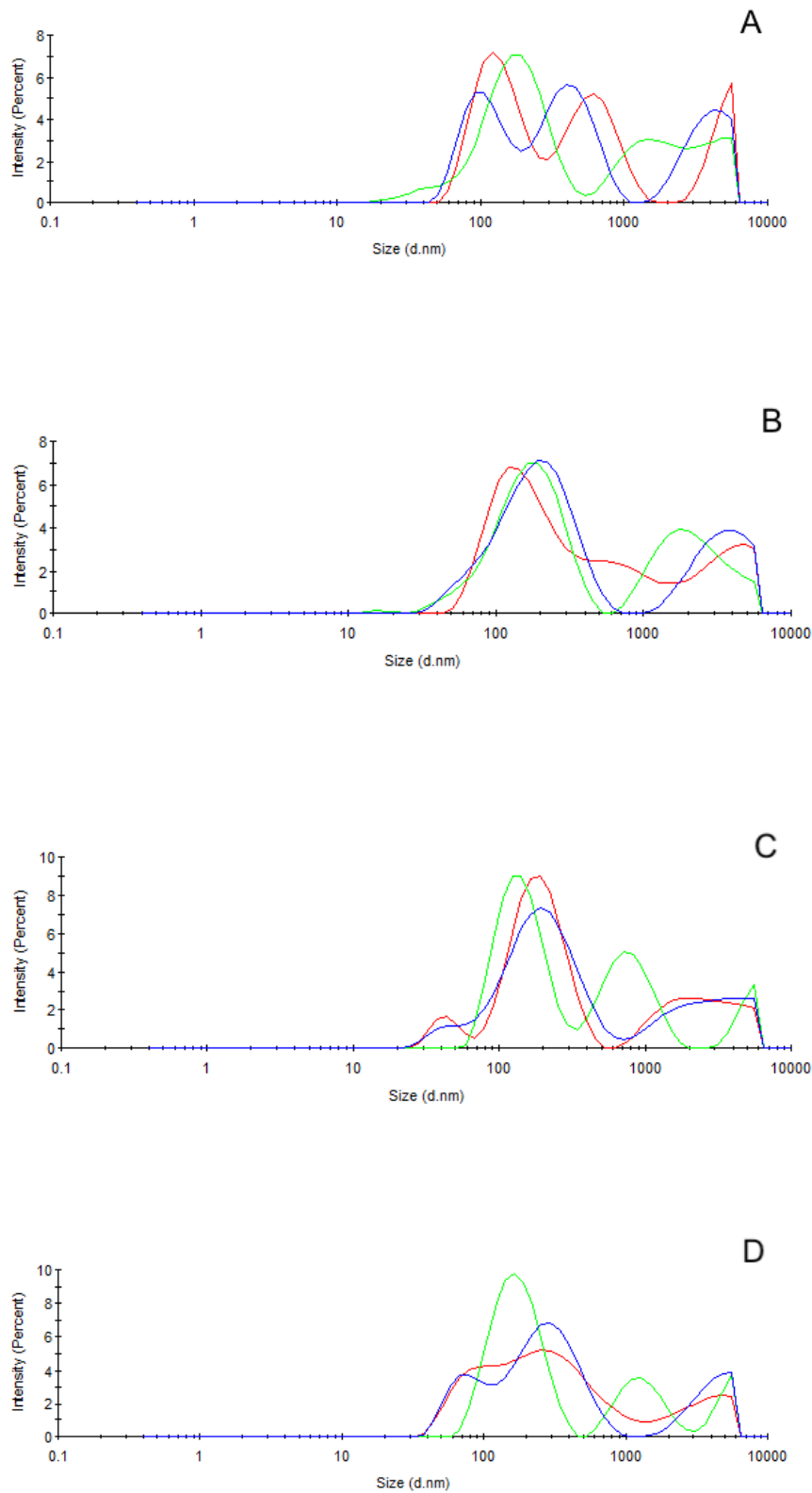
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 16– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



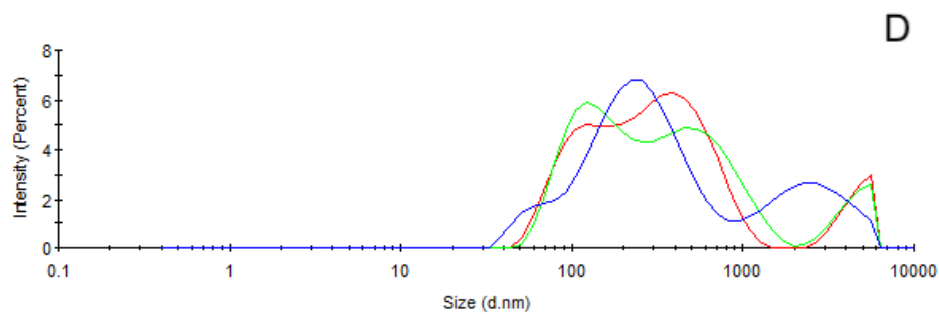
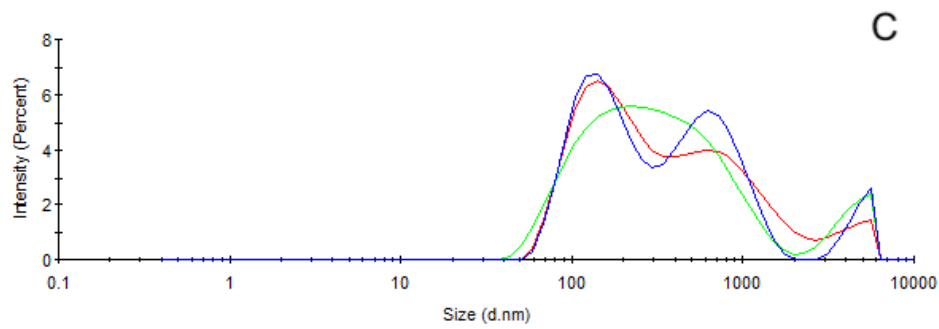
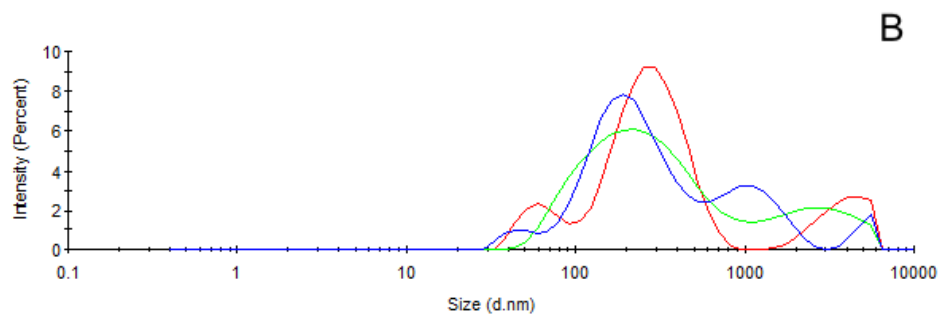
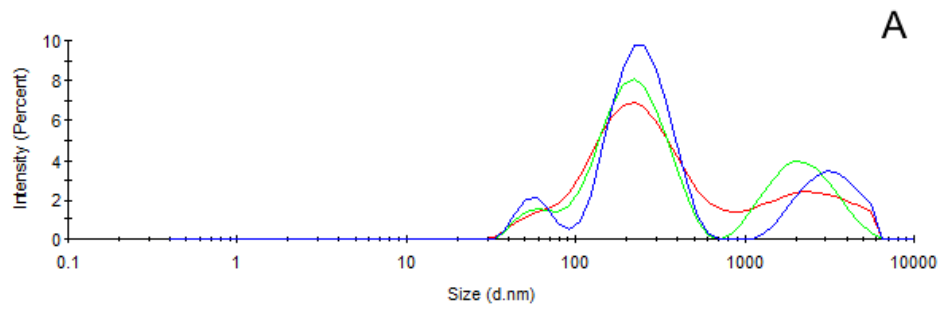
Polissorbato 20/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 16– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



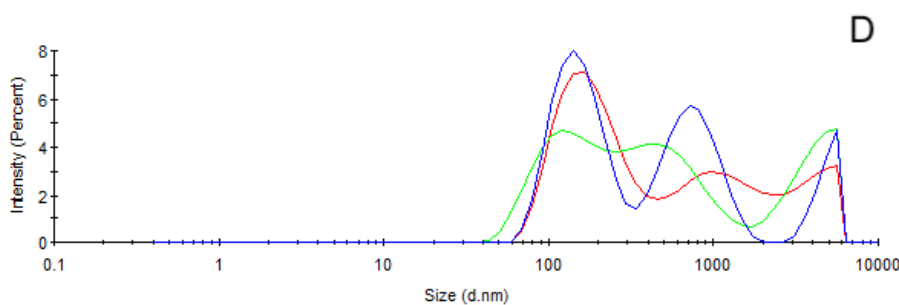
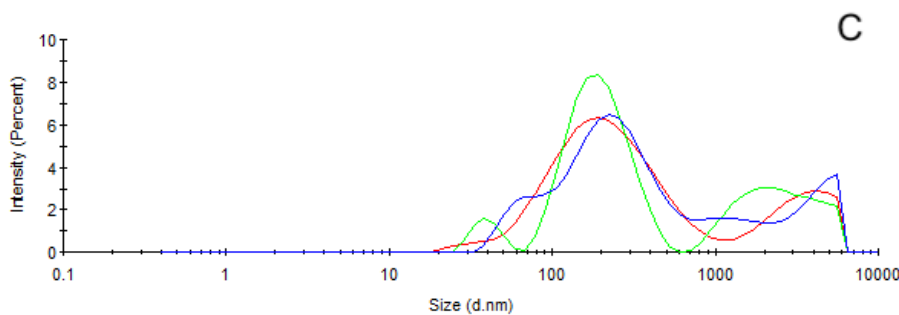
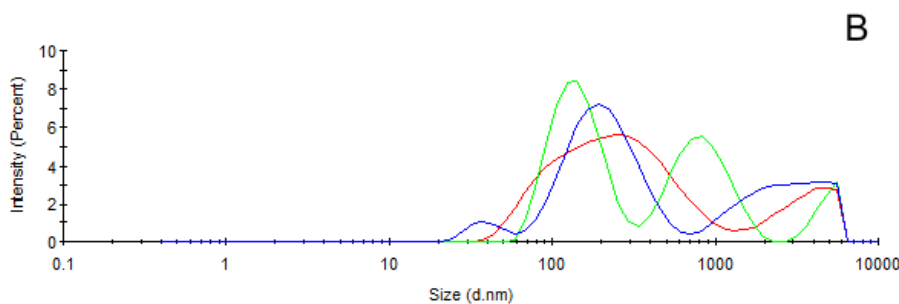
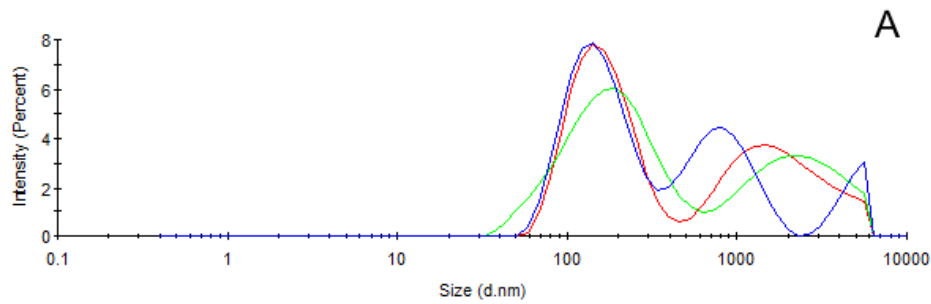
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 1) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



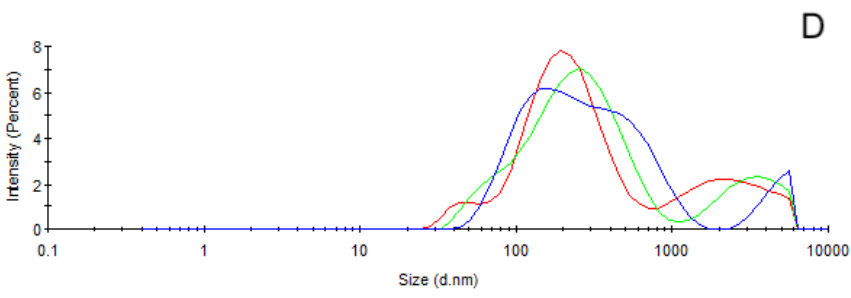
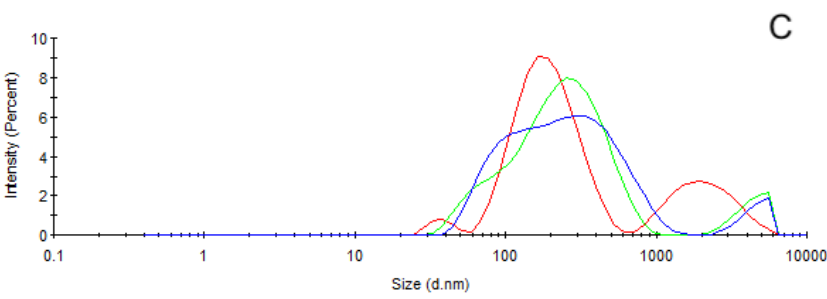
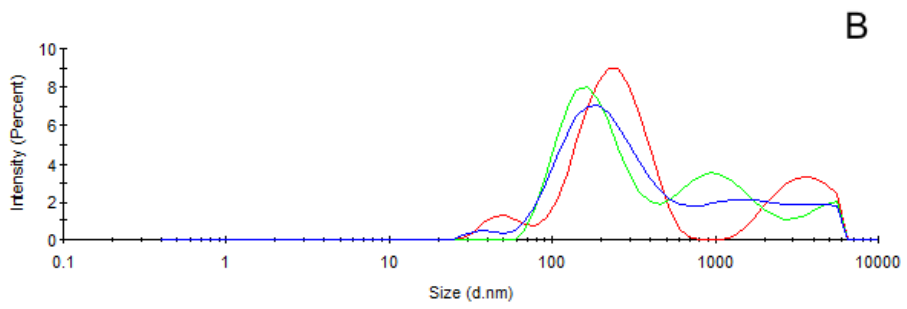
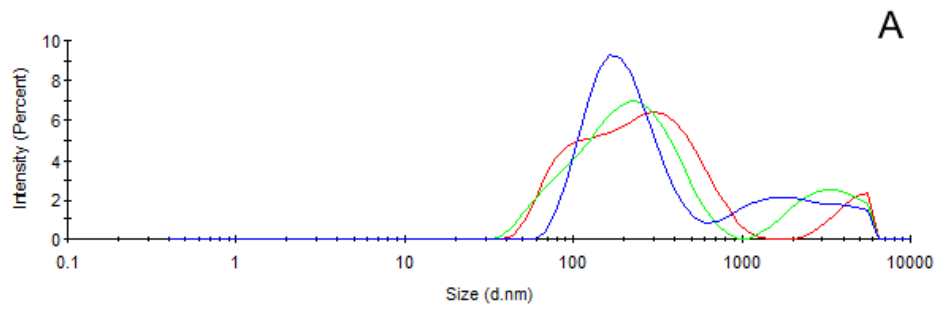
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 2) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



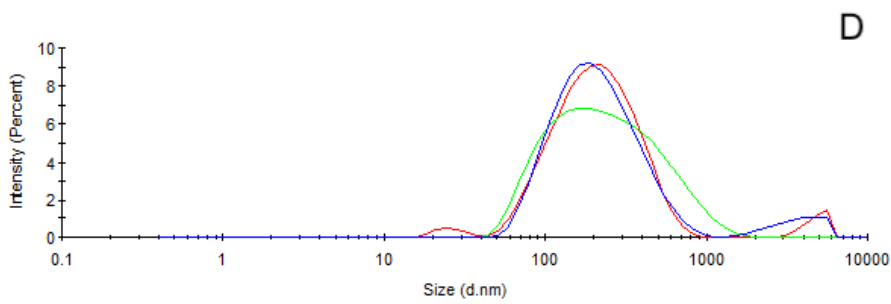
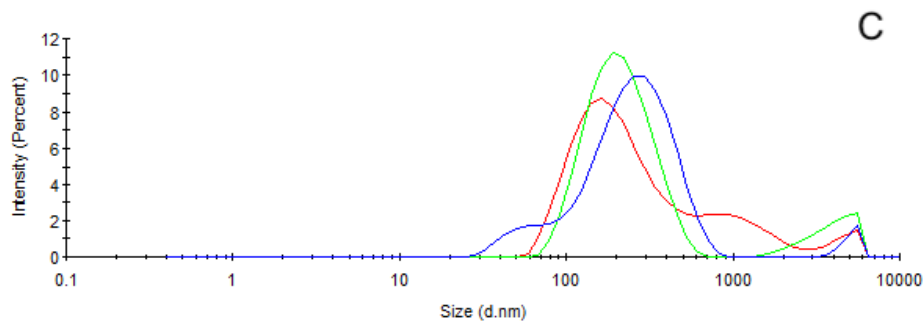
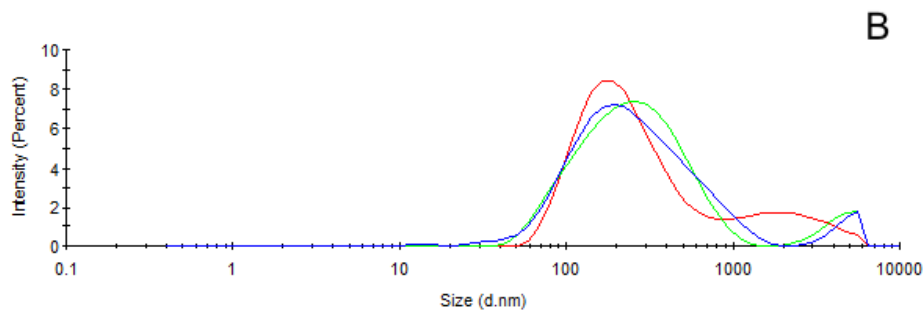
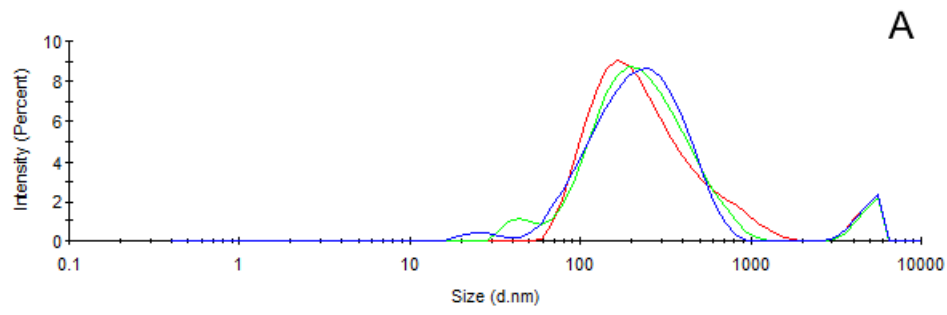
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 1) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



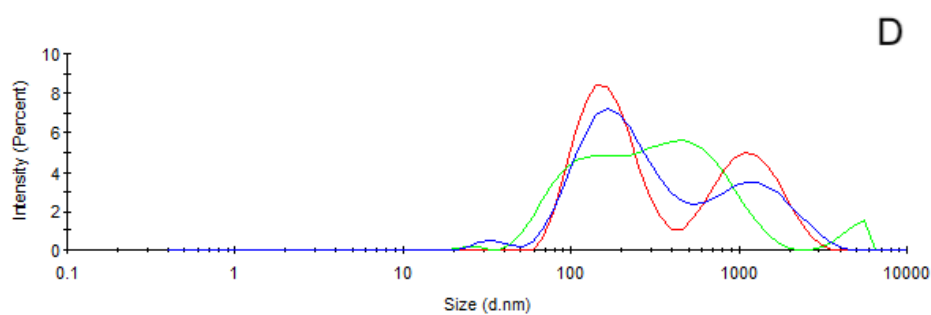
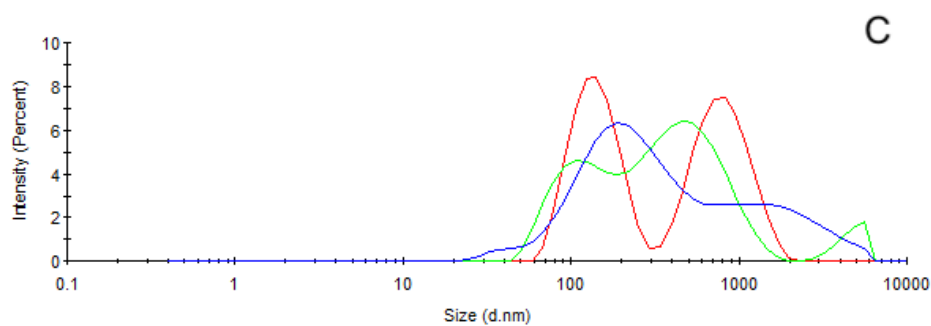
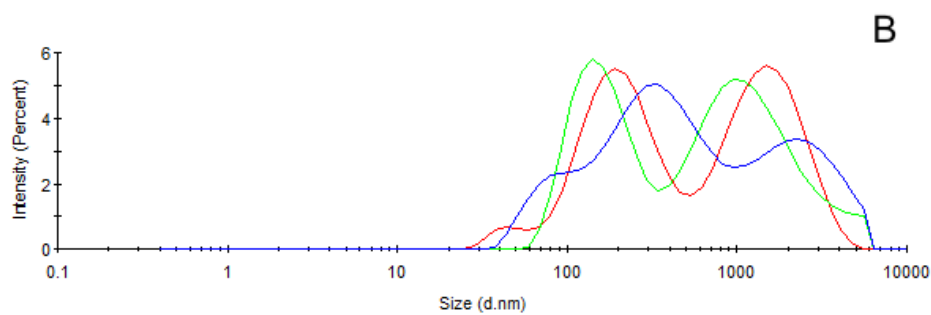
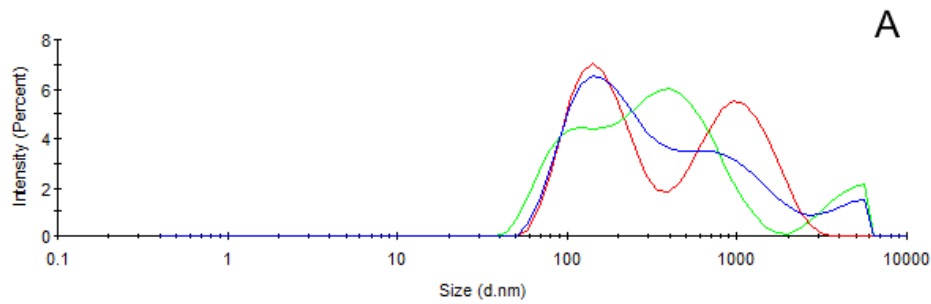
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 2) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



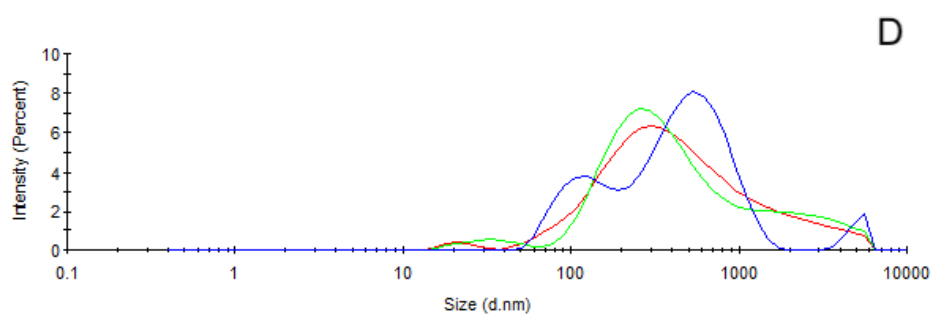
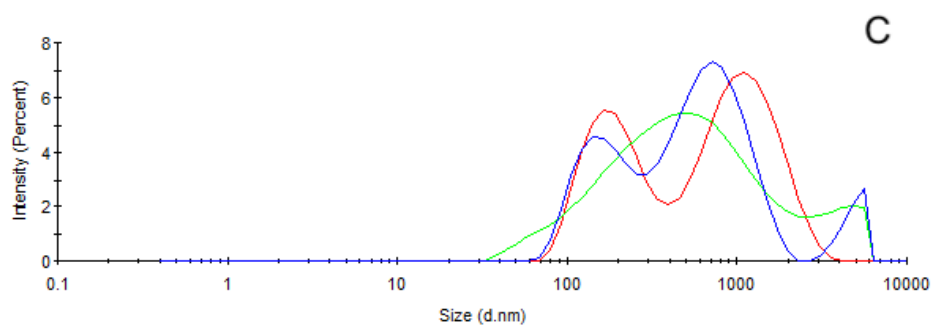
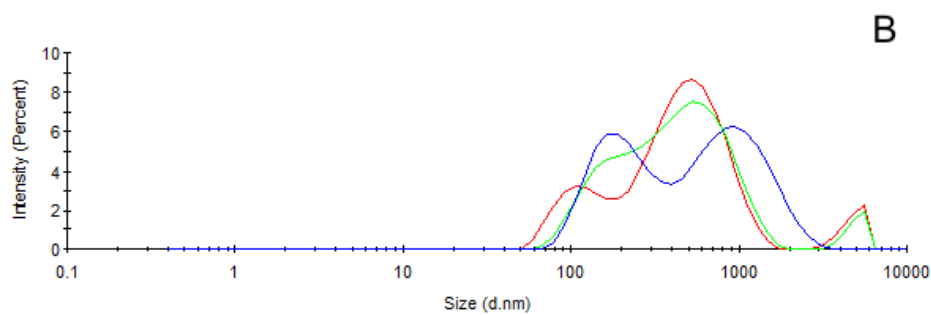
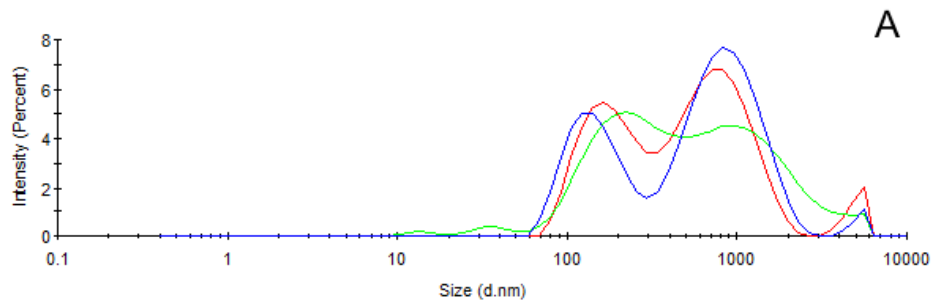
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 1) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



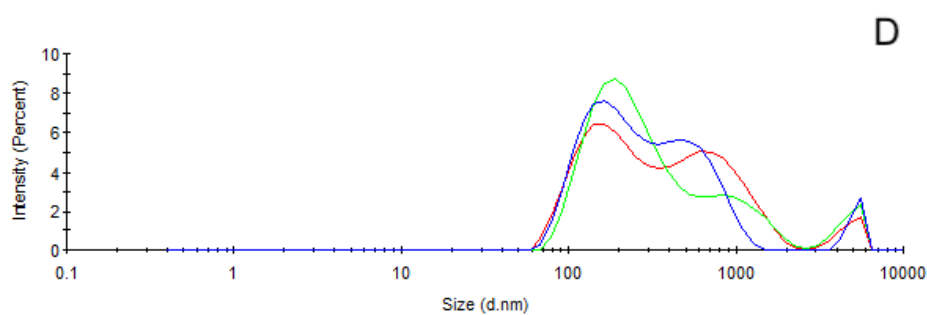
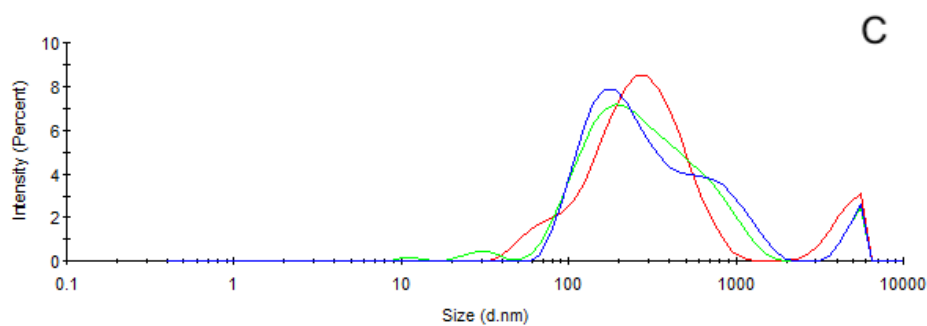
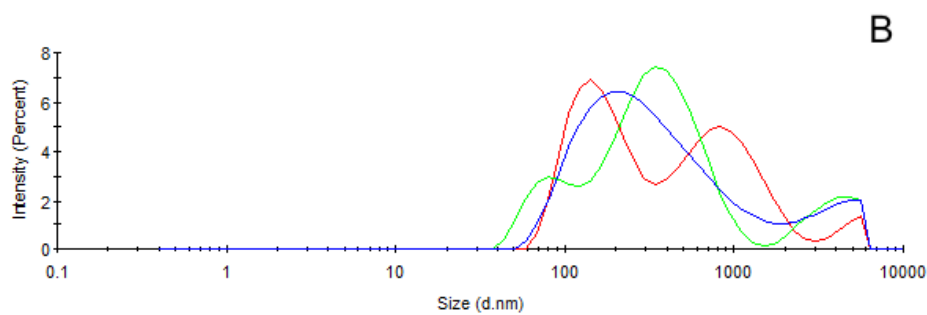
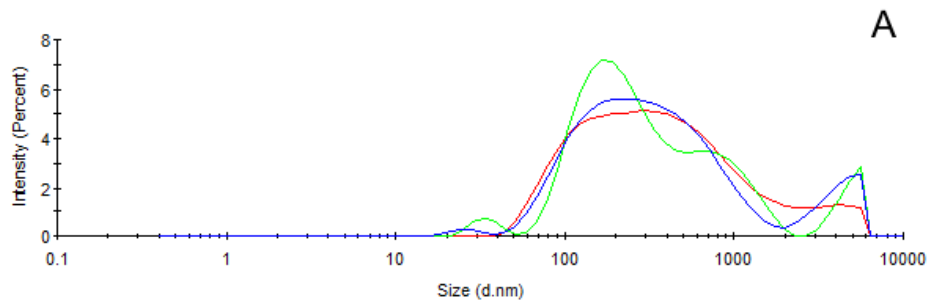
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 2) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



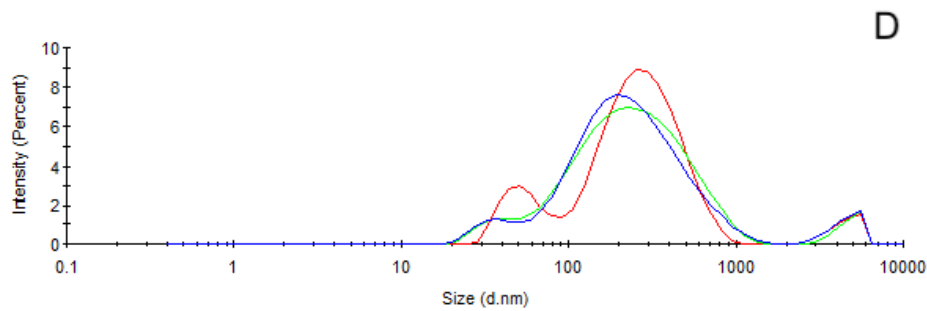
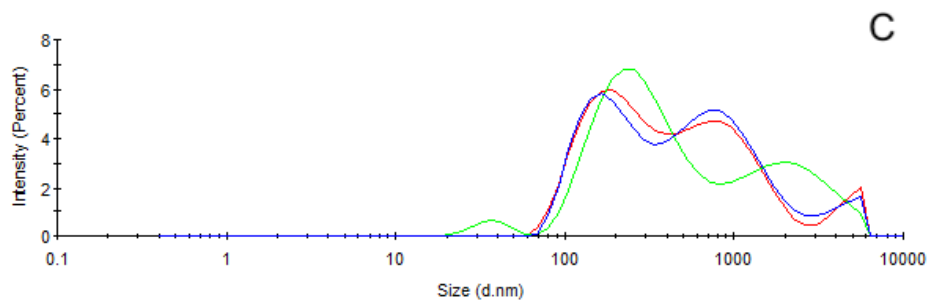
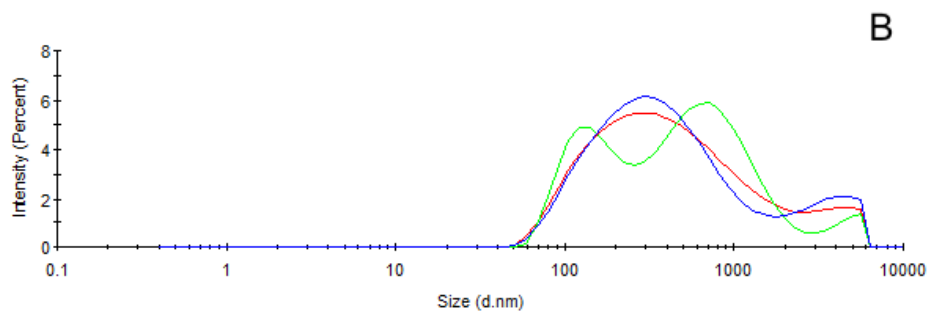
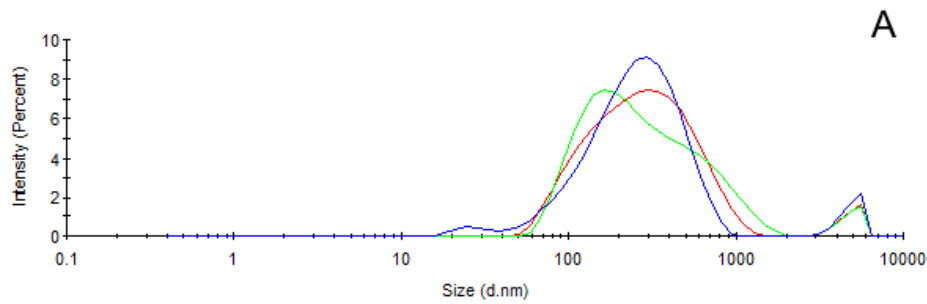
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 1) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



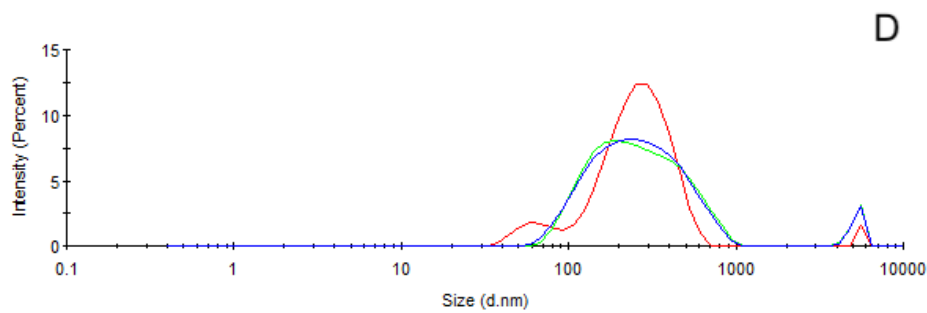
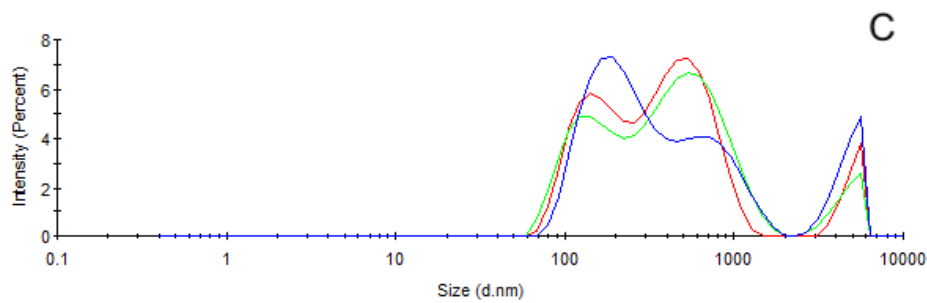
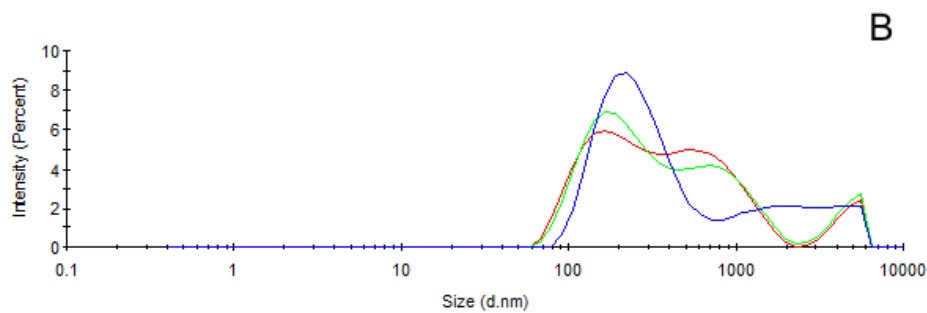
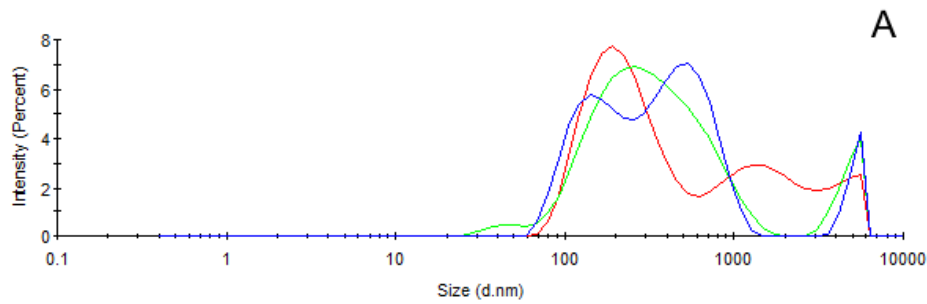
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 2) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



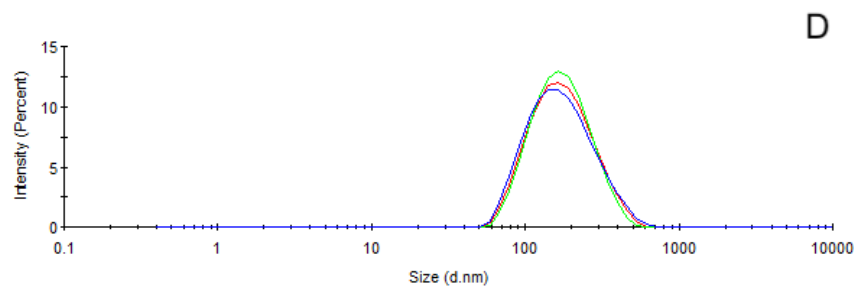
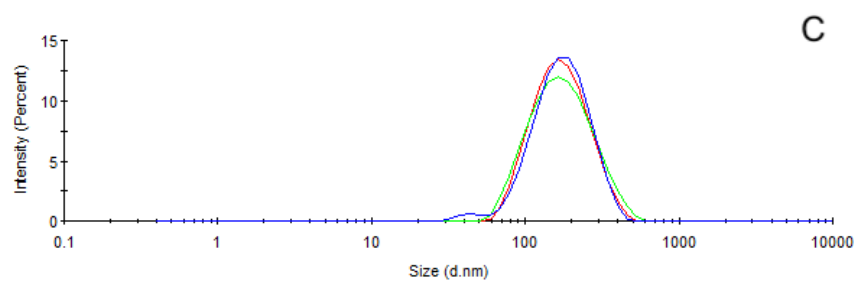
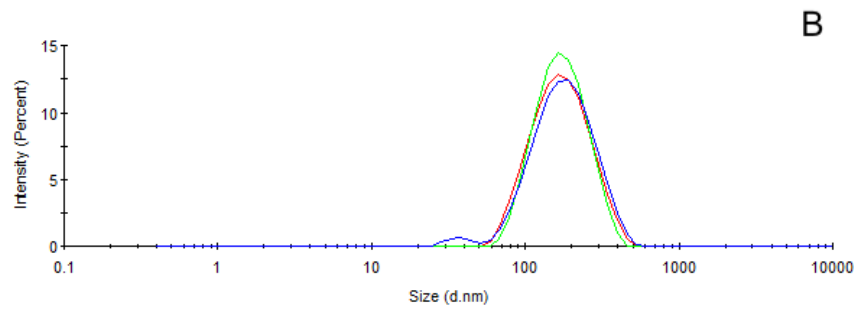
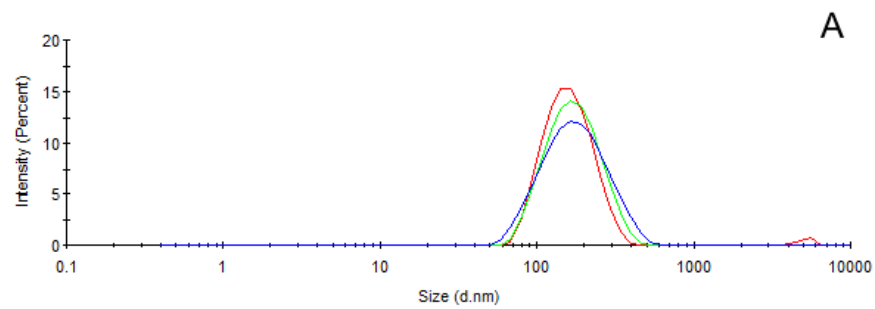
Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 1) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



Polissorbato 80/Monooleato de sorbitano(RTO 2) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)

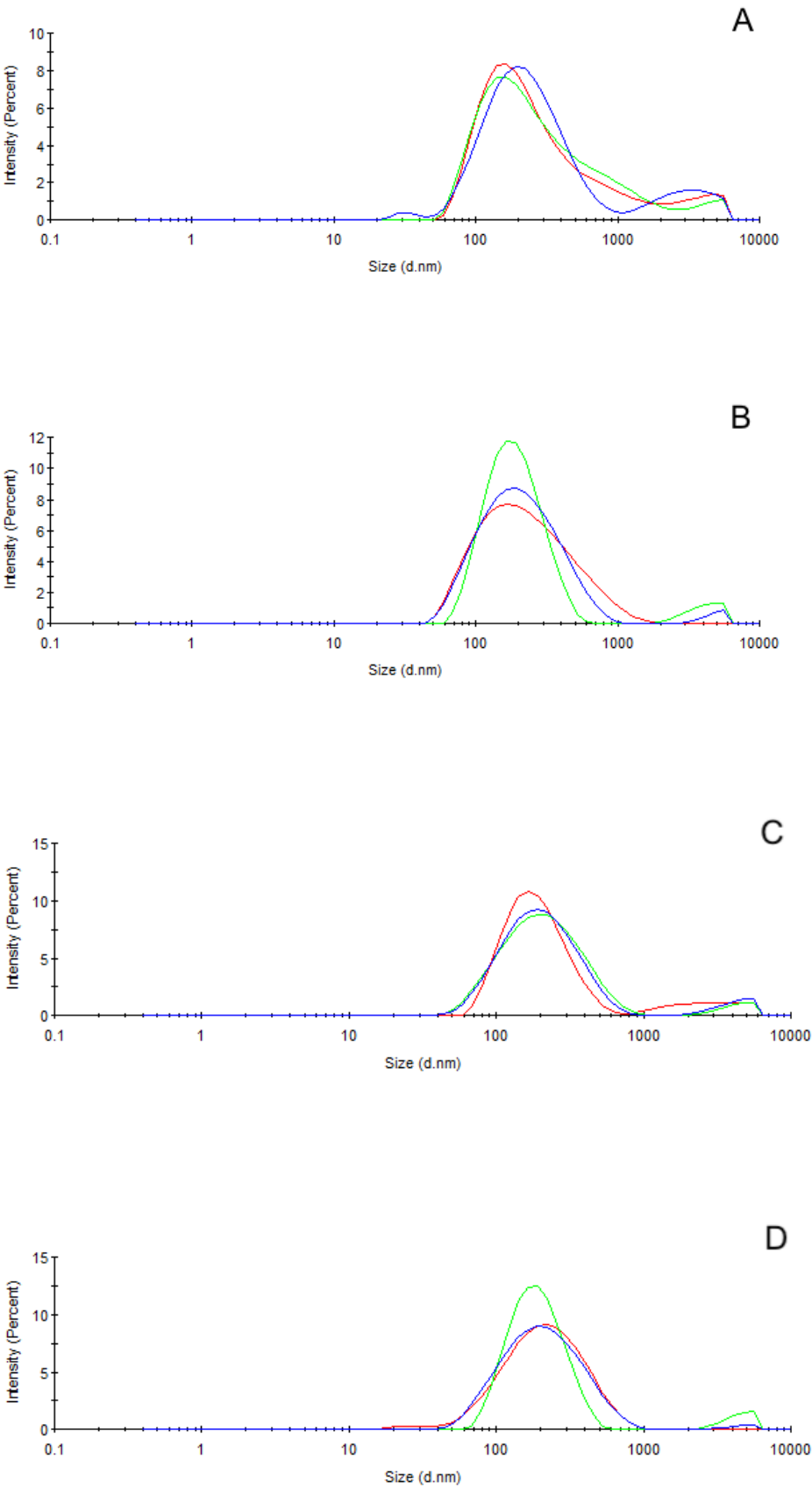


Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e (Dia14

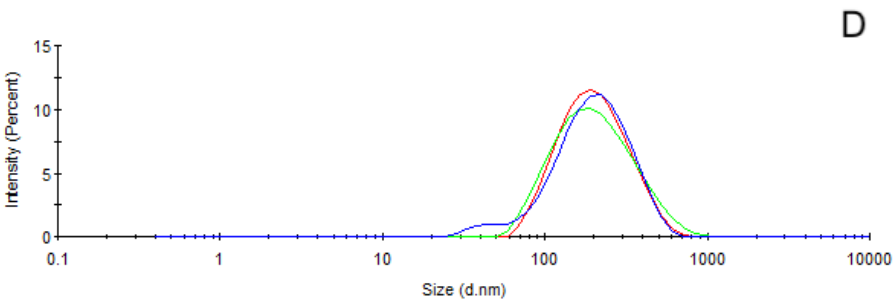
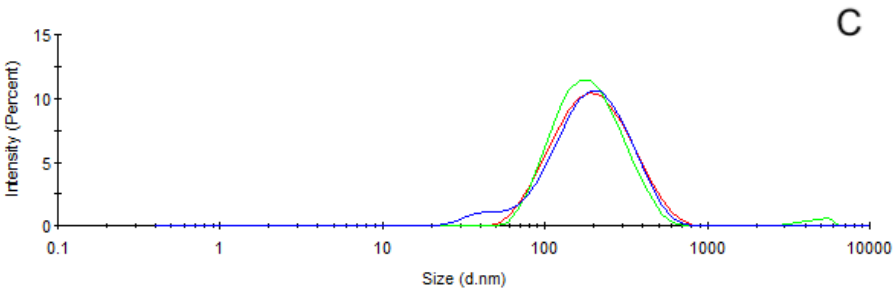
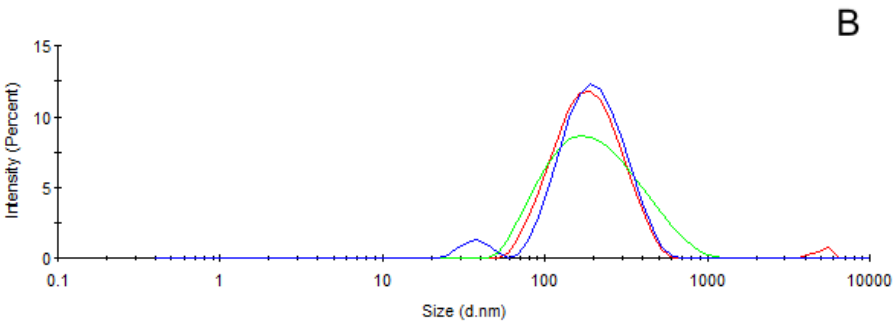
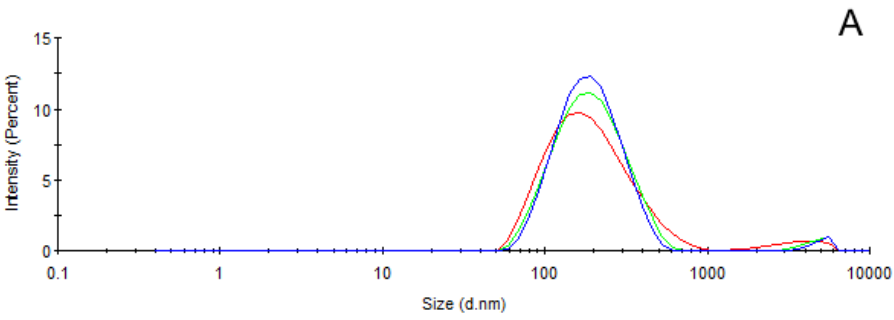


)

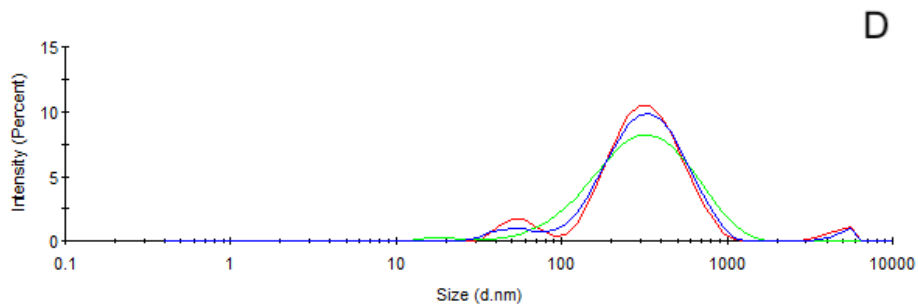
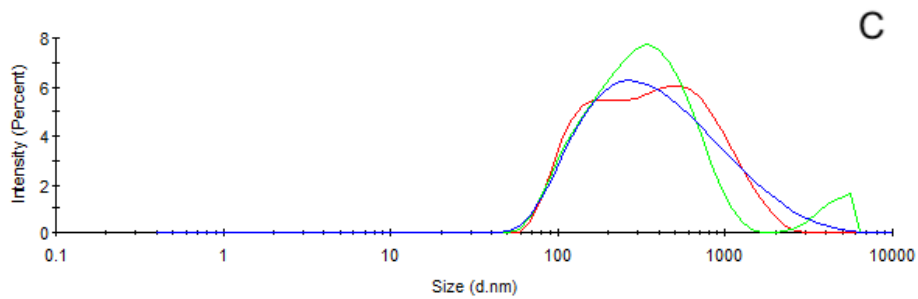
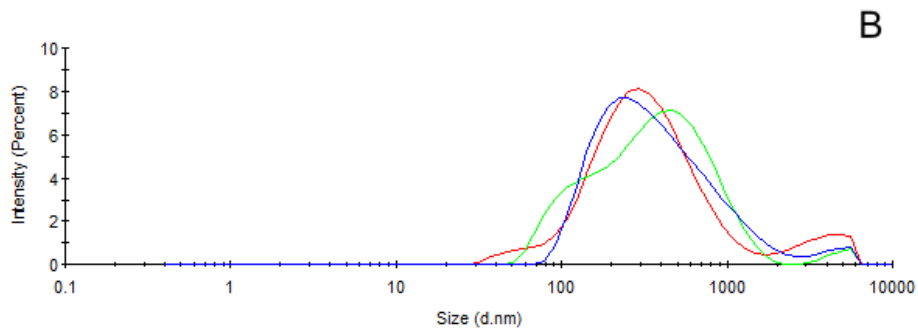
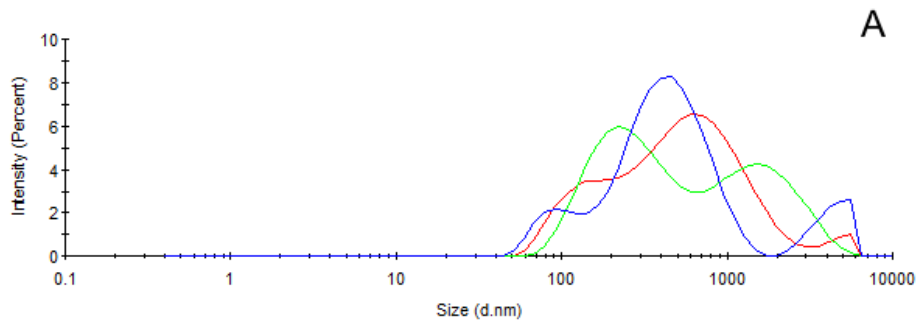
Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 10– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



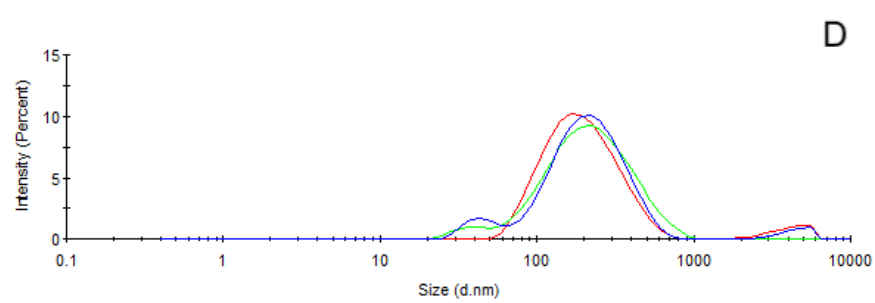
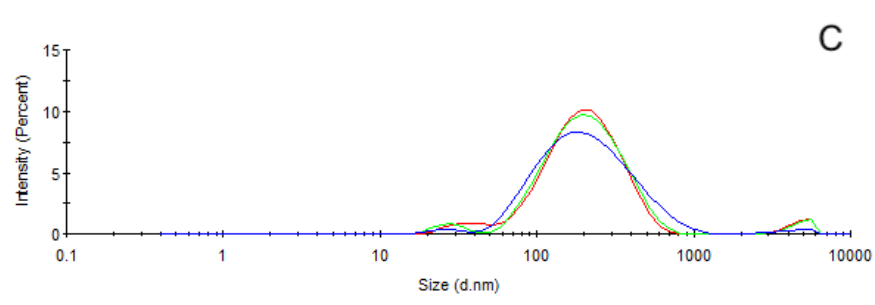
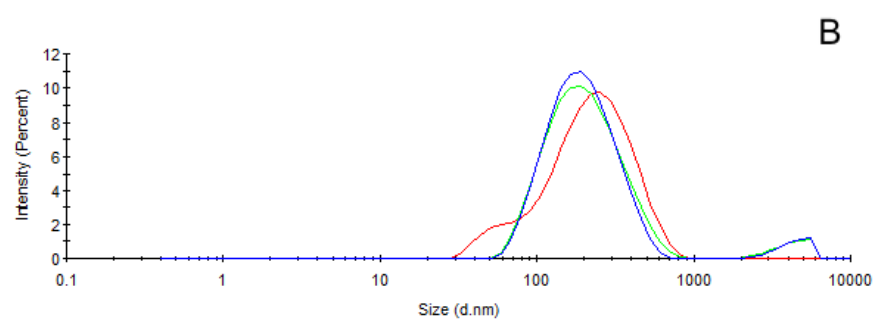
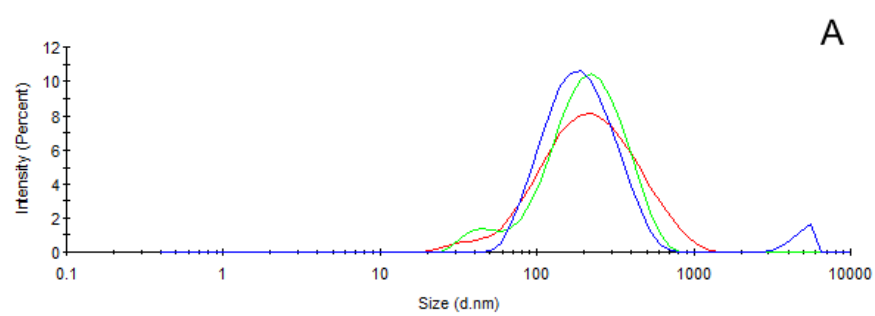
Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



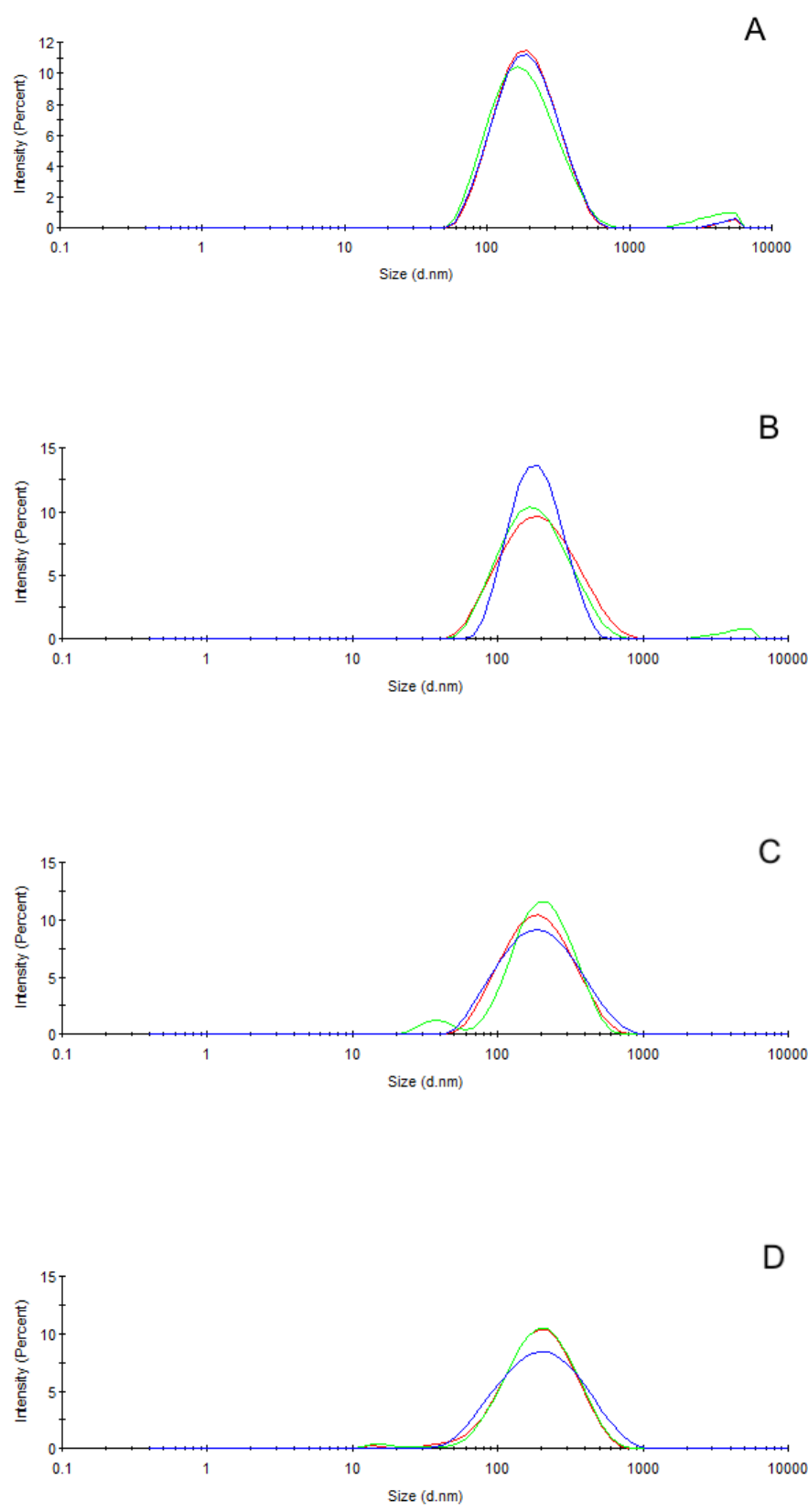
Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 11– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)



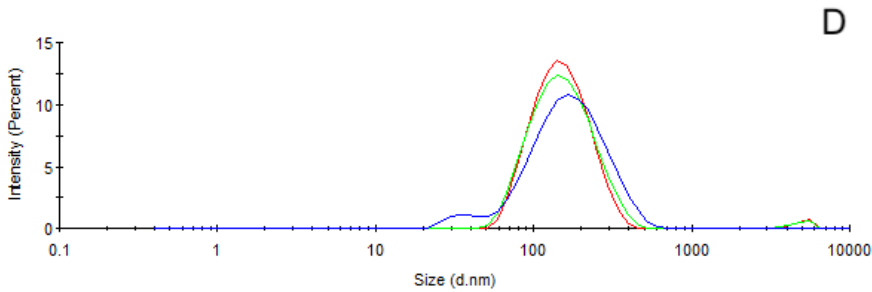
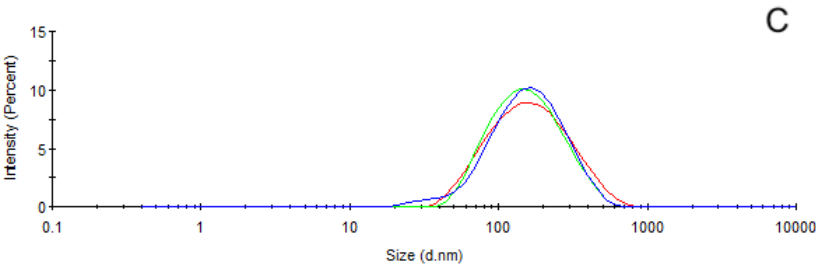
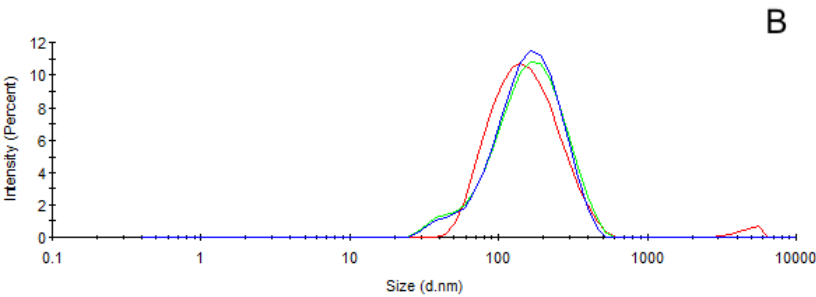
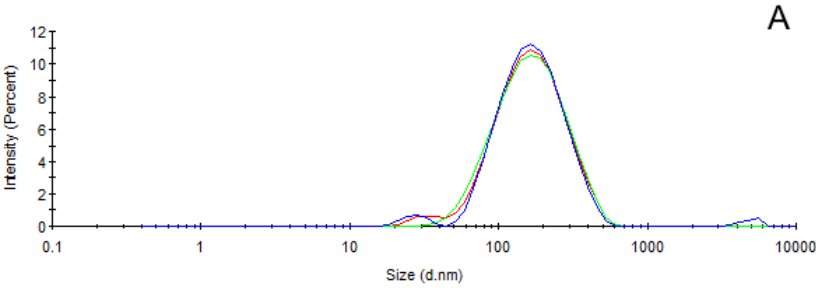
Polissorbato 80/Trioleato de Sorbitano (RTO 1) EHL 12 – A(Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia 14).



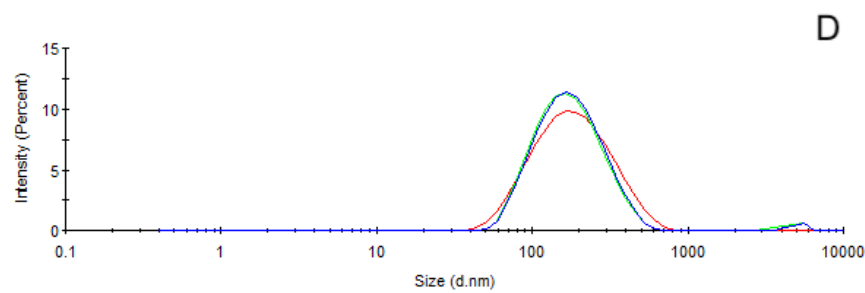
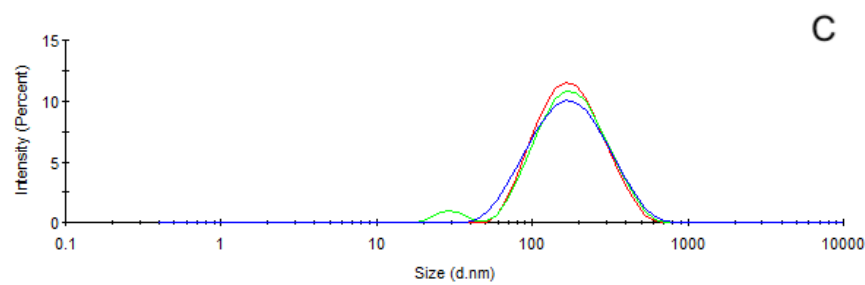
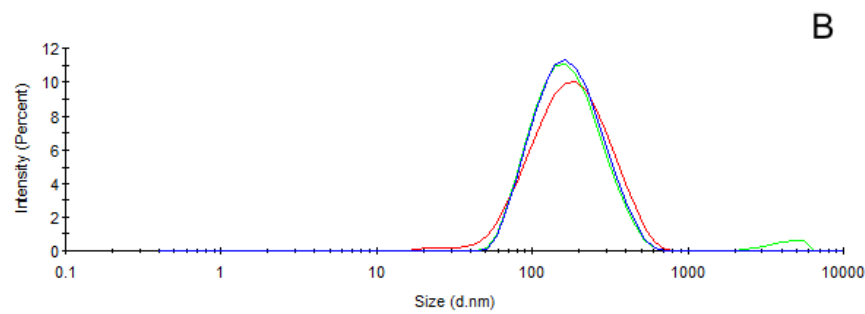
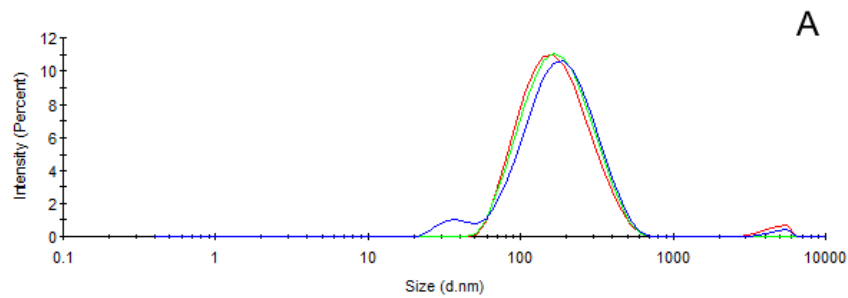
Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 12– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia 14).



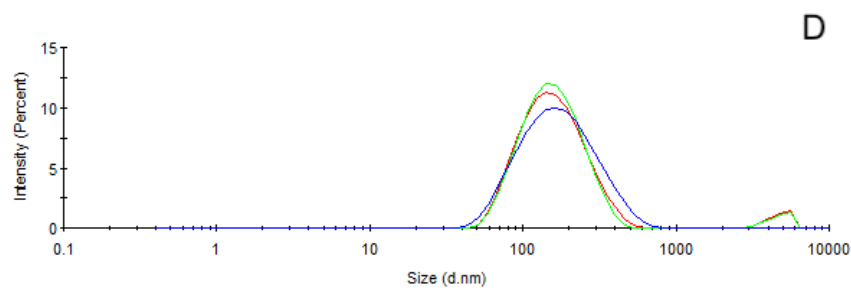
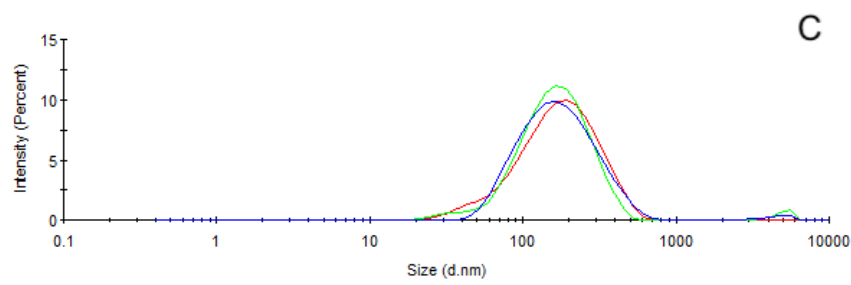
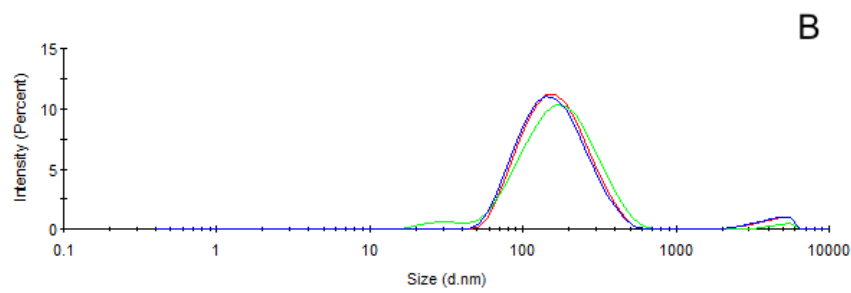
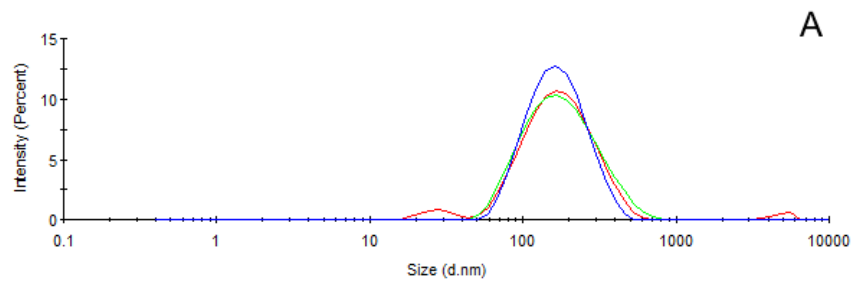
Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14).



Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 13– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14).



Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 1) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14).



Polissorbato 80/Trioleato de sorbitano(RTO 2) EHL 14– A (Dia 0), B (Dia 1), C (Dia 7) e D (Dia14)

