



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIÓLOGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA – PPG/NANO

TESE DE DOUTORADO

***DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA -
Copaifera multijuga Hayne E NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A
ITRACONAZOL E TERBINAFINA: ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.***

ALICE SPERANDIO PORTO

Brasília – DF

2020

ALICE SPERANDIO PORTO

***DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA -
Copaifera multijuga Hayne E NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A
ITRACONAZOL E TERBINAFINA: ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Judes Gonçalves dos Santos

Brasília – DF

2020

ALICE SPERANDIO PORTO

***DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA -
Copaifera multijuga Hayne E NANOPARTÍCULA DE PRATA ASSOCIADA A
ITRACONAZOL E TERBINAFINA: ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Judes Gonçalves dos Santos (Presidente-PPGNANO)

Prof. Dr. Sacha Braun Chaves (Membro-PPGNANO)

Prof. Dra. Luciene Batista da Silveira (Membro-Externo)

Prof. Dra. Rusleyd Maria Magalhães de Abreu (Membro-Externo)

Prof. Dr. Almeida Andrade Casseb (Suplente)

Brasília-DF, 26 de novembro de 2020.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

REITORA

Dra. Márcia Abrahão Moura

VICE-REITOR

Dr. Enrique Huelva

DECANA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Dra. Helena Eri Shimizu

DECANA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

Dra. Maria Emília Machado Telles Walter

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Jaime Martins de Santana

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E

NANOBIOTECNOLOGIA

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e grandes oportunidades profissionais.

À minha Família pelo apoio incondicional e incentivo aos estudos, em especial à minha Filha Sofia, pelo amor, admiração, respeito e compreensão devido minhas ausências para estudos.

Ao meu orientador, Prof. Judes Gonçalves dos Santos, pela paciência, incentivo e dedicação, principalmente, a oportunidade de realizarmos juntos esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, aos professores e técnicos que contribuem para a produção do conhecimento acadêmico e científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) por implementar os afastamentos integrais para capacitação que permitiram o meu acesso ao doutorado e pelo apoio recebido.

As Instituições envolvidas no desenvolvimento da Pesquisa, UnB, UNIR, IFRO e CEMETRON.

Ao LAMUTA/ UFMT pelas análises de FTIR, DRX e TGA, em especial a Dra. Fernanda Antunes pela realização das medidas.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio pela autorização de retirada do Óleo Resida de Copaíba, utilizado neste experimento.

A Rede BIONORTE- Acre, em especial a estudante de Doutorado Geysel Souza Santos pela realização dos ensaios antimicrobianos em bactérias e fungos.

A Professora Dra. Luciene Batista da Silveira pelo apoio em ceder o laboratório de física para a realização de procedimentos vinculados a esta pesquisa.

Ao Professor e Pesquisador Elton Bill, micologista clínico, que me orientou nos testes com Dermatófitos.

RESUMO

O presente estudo descreve a síntese, caracterização e testes antimicrobianos de Nanoemulsões à base de óleo de Copaíba, associações com medicamentos alopáticos (Itraconazol e Terbinafina) e nanopartículas metálicas aplicadas em fungos Dermatófitos. Foram realizados testes em colônia de bactérias com o objetivo de comparação com os resultados dos testes em fungos. O método empregado de *Combustão Líquida assistida por micro-ondas* propiciou, de forma prática e eficaz, a síntese de Nanopartículas de Prata (Ag-NPs) em escala nanométrica. Foram formuladas 12 amostras para testes, além do óleo de copaíba e Ag-NPs utilizados nos ensaios antimicrobianos. As nanoemulsões foram obtidas pelo emprego da técnica de *Inversão de Fases* associada a homogeneizadores de alta pressão, foram caracterizadas por meio de testes físico-químico e análise de *Potencial ZetaSizer* para verificar padrões de estabilidade. As amostras foram caracterizadas por Análise termogravimétrica (*TGA*), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Forrier (*FTIR*), Difractometria de Raios-X (*DRX*), Microscopia de Luz, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (*MET*). Os ensaios antimicrobianos foram realizados com bactérias Gram Positivas e Gram Negativas, fungos leveduriformes e fungo filamentoso. As formulações obtidas induziram uma resposta terapêutica e foram inibidoras de fungos leveduriformes *Candida parapsilosi* e *Staphylococcus aureus*, enquanto amostras de nanoemulsões contendo Terbinafina, apresentaram grande eficácia em testes realizados com *trichophyton rubrum*.

Palavras-chave: Óleo de Copaíba. Nanopartícula de Prata. Nanoemulsão. Itraconazol. Terbinafina. Fungos. Bactérias.

ABSTRACT

The present study describes the synthesis, characterization and antimicrobial tests of Copaiba oil-based nanoemulsions, associations with allopathic drugs (Itraconazole and Terbinafine) and metallic nanoparticles applied to dermatophyte fungi. Tests were carried out on colony of bacteria with the objective of comparison with the results of the tests on fungi. The microwave-assisted liquid combustion method provided, in a practical and effective way, the synthesis of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) on a nanometric scale. Twelve test samples were formulated, in addition to copaiba oil and Ag-NPs used in antimicrobial tests. The nanoemulsions were obtained using the Phase Inversion technique associated with high pressure homogenizers, were characterized by physical-chemical tests and ZetaSizer Potential analysis to verify stability patterns. The samples were characterized by Thermogravimetric Analysis (*TGA*), Infrared Spectroscopy with Forrier Transform (*FTIR*), X-Ray Diffractometry (*DRX*), Light Microscopy, Scanning Electron Microscopy (*SEM*), Dispersive Energy Spectroscopy (*EDS*), Transmission Electron Microscopy (*TEM*). The antimicrobial assays were performed with Gram Positive and Gram Negative bacteria, yeast-like fungi and filamentous fungus. The formulations obtained induced a therapeutic response and were inhibitors of yeast fungi *Candida parapsilosi* and *Staphylococcus aureus*, while samples of nanoemulsions containing Terbinafine, showed great efficacy in tests performed with *trichophyton rubrum*.

Keywords: Copaiba oil. Silver nanoparticle. Nanoemulsion. Itraconazole. Terbinafine. Fungi. Bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fungo <i>Trichophyton rubrum</i> , em objetiva de 400X. Fonte: Cepem/RO.....	15
Figura 2: Estrutura da Pele [20].....	19
Figura 3: Imagem de <i>T. rubrum</i> em epiderme da bolsa escrotal de homem imunodeprimido, obtida por MEV [32]	21
Figura 4: Manifestações clínicas das Dermatofitoses. A: <i>Tinea corporis</i> ; B: <i>Tinea barbae</i> ; C: <i>Tinea corporis</i> ; D: <i>Tinea pedis</i> [23;36] (adaptado).....	21
Figura 5: Estrutura Química do Itraconazol. [43]	23
Figura 6: Estrutura Química da Terbinafina.[50]	24
Figura 7: Microfotografias por MET de <i>Candida albicans</i> , em A não tratadas com emulsão; em B dano celular causadas por tratamento com nanoemulsão [13].....	25
Figura 8: Comparação entre uma nanoemulsão (esquerda) e uma macroemulsão (direita) com diâmetros das gotículas de 35 nm e 1 µm, respectivamente [66].....	26
Figura 9: Morfologia dos tipos de nanoemulsões: A/O, O/A e sistemas múltiplos [71; 72; 73].....	27
Figura 10: Componentes da Nanoemulsão [78] (adaptado).....	28
Figura 11: Processo de cisalhamento (a)/ (b)/ (c)/ (d); NE estável (e); fotomicrografia NE (f) [77] adaptado.....	28
Figura 12: Alguns sesquiterpenos encontrados no gênero <i>Copaifera</i> . [90]	30
Figura 13: Cromatograma típico de óleo de copaíba [91]	30
Figura 14: Procedimento simplificado da síntese de NPs por combustão líquida assistida em micro-ondas.....	39
Figura 15: Processo de extração do óleo de Copaíba.....	42
Figura 16: Procedimento de preparação dos meios de culturas para avaliação das amostras de Ag-NPs e NEs.....	47
Figura 17: Procedimento de semeadura em meio de cultura onde, ajuste turbidez da escala McFarland (a); perfuração de poços para inoculação das amostras (b); representação do processo de extração de medidas dos halos (c) e formação de halos como resposta a solução antimicrobiana utilizada (d).....	48
Imagem 18: Fotomicrografia nas Ag-PNs das amostras de da EB antes da calcinação em 30.000x (A) e pós calcinação em 22.000x (B); -25% sem calcinação 30.000x (C) e pós calcinação 25.000x (D); +25% sem calcinação 8.500x (E) e pós calcinação 30.000x (F).....	51
Figura 19: Imagens de elétrons retro-espalhados de amostra com +25% catalisador antes da calcinação (A), +25% catalisador pós calcinação (B), -25% catalisador antes da calcinação (C) e -25% catalisador pós procedimento de calcinação.....	52
Figura 20: Fotomicrografias de Ag-NPs sintetizadas por via de Combustão Líquida Assistida, dispersas sobre o grid de cobre e obtidas por MET onde: de amostra com +25% catalisador antes da calcinação (A), +25% catalisador pós calcinação (B), -25% catalisador antes da calcinação (C) e -25% catalisador pós procedimento de calcinação.....	53
Figura 21: Termograma TG (Linha preta) e DTG (Linha azul) das Ag-NPs obtidas pelo método da Combustão Líquida assistida via micro-ondas com 25% + de catalisador a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e faixa de temperatura de 25-500°C.....	54
Figura 22: Espectro das Ag-NPs sintetizadas pelo método da Combustão Líquida Assistida via micro-ondas com 25% + de catalisador.....	55
Figura 23: Difratograma de raios-X das Ag-NPs sintetizadas pelo método da Combustão Líquida Assistida via micro-ondas com 25% + de catalisador.....	56

Imagem 24: Microscopia de luz das nanoformulações-teste realizadas em objetivas de 10X e 40X.....	58
Figura 25: Nanoformulações associadas após 24 horas de síntese, observação quanto ao aspecto de separação de fases.....	59
Figura 26: microscopia de luz das nanoformulações associadas, realizadas em objetivas de 10X e 40X.....	60
Figura 27: Valores do pH obtidos para nanoemulsão armazenada sob temperatura ambiente (25±2°C)	61
Figura 28: Caracterização morfológica das nanoemulsões por MEV e seus respectivos gráficos de Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-x. Nanoestruturas com formatos irregulares apresentando superfícies rugosas. N1- NE padrão 20.000x, N3 – NE formulada com NPs-Ag 10.000x, N6 – NE formulada com Ag-NPs e Itraconazol 18.000x.....	65
Figura 29: Caracterização morfológica das nanoemulsões por MEV e seus respectivos gráficos de Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-x. Nanoestruturas com formatos irregulares apresentando superfícies rugosas onde, N9 – NE formulada com Ag-NPs e Terbinafina 10.000x, N11 – NE formulada com Itraconazol 23.000x e N12 – NE formulada com Terbinafina 15.000x onde a amostra apresentou constituída do elemento Ag.....	66
Figura 30: Fotomicrografias da NEs padrão formulada a base de OCO (N1) e NE padrão associada a 0,01g de NPs-Ag (N3), 40.000x.....	67
Figura 31: Fotomicrografias da NE associada com Ag-NPs e Itraconazol (N6) e NE associada com Ag-NPs e Terbinafina (N9), 40.000x.....	68
Figura 32: Fotomicrografias da NE associada (N11), formulada com Itraconazol. Fotomicrografias da NE associada (N12), formulada com Terbinafina, 40.000x.....	69
Figura 33: Distribuição do PZ nas formulações que apresentaram resultados de NEs estáveis (resistente a agregação)	71
Figura 34: Diâmetro das formulações associadas (A) - E1/E2/E3/E4; (B) – E1/E3/E6/E9; (C) – E1/E11/E12.....	72
Figura 35: Efeito inibidor das diferentes amostras testadas.	73
Figura 36: Resultados dos testes de susceptibilidade para <i>Cândida albicans</i> (A), <i>Cândida tropicalis</i> (B) e <i>Cândida parapsilosis</i> (C) utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud dextrose incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.....	75
Figura 37: Resultados dos testes de susceptibilidade para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Mueller Hinton incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os fármacos e suas atividades terapêuticas [9]	16
Tabela 2: Reagentes e materiais utilizados na síntese de Ag-NPs e formulações das NEs.....	37
Tabela 3: Valores de referência para PDI [136]	45
Tabela 4: Descrição das estirpes de microorganismos utilizados para testes e respectivas concentrações das amostras testadas.....	46
Tabela 5: Análise Macroscópica e Microscópica das formulações de NEs-Teste.....	58
Tabela 6: Análise Macroscópica e Microscópica das formulações associadas.....	59
Tabela 7: Avaliação do pH das nano formulações a base de OCO.....	61
Tabela 8: Comparação do valor do PH e condutividade das formulações obtidas.....	62
Tabela 9: Comportamento das formulações frente ao teste de centrifugação.....	63
Tabela 10: Comportamento das formulações frente ao teste de estresse térmico.....	64
Tabela 11: Valores do pH antes e após teste de estresse térmico.....	64
Tabela 12: Diâmetro, Índice de Polidispersão e Zeta das formulações calculados por Difração dLaser.	70
Tabela 13: Resultados dos testes de susceptibilidade para <i>T. rubrum</i> utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.	74
Tabela 14: Resultados dos testes de susceptibilidade para <i>Candida sp.</i> utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud dextrose incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.	75
Tabela 15: Resultados dos testes de susceptibilidade para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Mueller Hinton incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP– Água purificada.

A/O – Nanoemulsão água em óleo.

Ag-NPs – Nanopartículas de Prata.

D - densidade.

DM – Diâmetro médio das partículas.

EHL– Equilíbrio Hidrofílico-lipofílico.

IPD – Índice de polidispersividade.

MEV– Microscopia Eletrônica de Varredura.

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão.

NCL – Modelo de cristalino.

NEs – Nanoemulsões

NP – Nanopartícula Magnética.

O/A– Nanoemulsão óleo em água.

OCO– Óleo de Copaíba

PM- Peso molecular.

pH – Potencial Hidrogênio.

PZ- Potencial Zeta.

$\mu S/cm$ – Microsiemens por centímetros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Dermatofitoses.....	17
2.2 Fármacos Antifúngicos.....	21
2.3. Nanotecnologia: Nanofármacos.....	23
2.4 Nanoemulsões.....	25
2.5 Obtenção e composição de Nanoemulsões.....	27
2.6 Nanoemulsões associadas a Antifúngicos convencionais: Nanomedicamentos X Alopáticos...	28
2.7Propriedades terapêuticas do O.C.O (<i>C. multijulga</i> Hayne) e nanoformulações.....	30
2.8 Síntese de Ag-NPs	31
2.9 Ensaios Antimicrobianos.....	32
3 JUSTIFICATIVA.....	34
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo Geral.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1. Reagentes e Materiais	36
5.2 Planejamento experimental.....	37
5.2.1 Preparo das Nanopartículas.....	37
5.2.2Técnicas de Caracterização aplicadas às Nanopartículas.....	38
5.2.3 Preparo das Nanoemulsões.....	40
5.2.4 Técnicas de Caracterização e estabilização aplicadas das Nanoemulsões.....	42
5.2.5 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.1 Formação e caracterização das de Ag-NPs.....	49
6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49

6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	51
6.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	52
6.1.4. Termogravimetria (TG)/DTG.....	53
6.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53
6.1.6 Difração de Raios X (DRX).....	54
6.2. Formulações das NEs e Testes de Estabilidade.....	55
6.2.1 Determinação dos valores de PH.....	60
6.2.2 Condutividade.....	61
6.2.3 Centrifugação e Estresse Térmico.....	62
6.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
6.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	66
6.2.6 Potencial ZetaSizer.....	69
6.3.2 Avaliação da susceptibilidade em fungos e bactérias.....	80
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	77
7.1 Conclusão.....	77
7.2 Perspectivas Futuras.....	78
8 REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

As infecções por fungos são um dos problemas de saúde mais importantes que as pessoas enfrentam há muito tempo [1]. Os fungos que causam infecções superficiais (Dermatofitoses) são denominados Dermatófitos e geralmente invadem e parasitam apenas as camadas queratinizadas da pele, unhas e cabelos [2]; abrangendo espécies dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporium* e *Trichophyton*. A Dermatofitose é uma doença comum em países tropicais devido a fatores como calor e umidade, que oferece um ambiente fértil para a proliferação dos fungos [3]. São necessárias várias etapas para que a infecção ocorra: contato, adesão e invasão das camadas de queratina da pele, sendo a gravidade da infecção dependente do tipo de agente, dos fatores ambientais e status imunológico do hospedeiro [4]. As infecções dermatofíticas são comumente referidas pela região do corpo em que se localizam, por exemplo: *Tinea pedis*, envolvendo o pé; *Tinea capitis*, envolvendo a cabeça e assim por diante [5].

O *Trichophyton rubrum* (Figura 1) é considerado o fungo mais comum em desencadear micoses superficiais que variam dinamicamente, e dependem das condições socioeconômicas e das práticas culturais [6]. Trata-se de um importante agente causador de dermatomicoses superficiais, como a oncomicosose e *Tinea pedis*, e é conhecido por ser o responsável por 69,5% de todas as infecções por dermatófitos [7]. As manifestações clínicas são caracterizadas por descamação e maceração da pele, sensibilidade, coceira e sujeira, sendo o tratamento, geralmente, realizado com ingredientes farmacêuticos ativos antifúngicos (API) aplicados localmente, como a Terbinafina, Miconazol, Clotrimazol, Econazol ou cetoconazol [6].

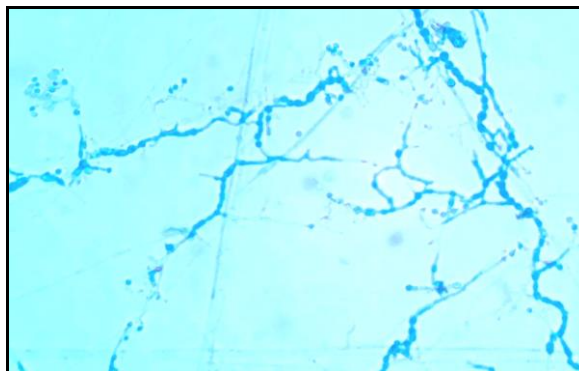


Figura 1: Fungo *Trichophyton rubrum*, em aumento de 400X por microscopia de luz. Fonte: Cepem/RO.

Para [8], a maioria das infecções cutâneas é tratada com antifúngicos tópicos contendo naftidina, tolnafato, terbinafina ou itraconazol, associados a terapias orais de griseofulvina, terbinafina e itraconazol, sendo a terbinafina e compostos do tipo azóis as substâncias que carregam riscos de efeitos colaterais cardíacos e hepáticos e interações medicamentosas (Tabela 1).

Tabela 1: Os fármacos e suas atividades terapêuticas. Fonte: [9].

Fármaco	Atividade
Terbinafina	Interfere na biossíntese do ergosterol/inibindo o crescimento do fungo.
Griseofulvina	Interfere na função dos microtúbulos, inibindo a mitose celular. É também um antagonista da síntese de quitina na parede celular dos fungos.
Fluconazol	É um agente fungistático, afetando a conversão de lanosterol em ergosterol, levando a ruptura do fungo.
Acriflavina	Interfere nos processos de replicação, transcrição e tradução de RNA e DNA

Os efeitos colaterais adversos relacionados ao tratamento das Dermatofitoses estão associados com o uso de drogas antifúngicas disponíveis, incluindo nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade e, além disso, a resposta terapêutica é lenta em pacientes imunocomprometidos [10]. Segundo [9], os agentes antifúngicos atualmente disponíveis contra os dermatófitos são escassos e apresentam limitações quanto à eficácia e toxicidade, inclusive, o uso indevido de anti-micóticos na prática de procedimentos médicos invasivos e o início da AIDS levaram a casos de reincidência de micoses causadas por *T. rubrum*.

No geral, o ônus das infecções por *Tinea* exerce uma profunda negatividade quanto ao efeito na qualidade de vida do paciente [11], sem contar que os fungos podem apresentar resistência a moléculas antifúngicas tornando invasivo o tratamento dos pacientes com infecção fúngica [12].

Diante dessa problemática, a busca de agentes tópicos eficazes sempre foi desafiadora devido aos efeitos colaterais dos medicamentos e resistência adquirida, já que atualmente, os medicamentos antifúngicos disponíveis são inibidores das vias metabólicas dos fungos, mas mesmo não produzindo efeitos adversos e colaterais nas doses prescritas, eles não são muito eficazes [13].

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que pode ser aplicada em diversas áreas dentre elas, a área farmacêutica [14] podendo ser utilizada para solucionar problemas relacionados a fármacos e medicamentos, destacando-se os nanocarreadores [15]. As nanoemulsões, por exemplo, são sistemas formados por uma mistura homogênea de dois ou mais líquidos imiscíveis com tamanho de gotícula na faixa de 10 a 200 nm [16]. Elas possuem propriedades de encapsulamento e podem ser adaptadas para uma variedade de usos, além disso, as nanoemulsões não são tóxicas para pele, mucosas, membranas e tecido gastrointestinais quando em concentrações biocidas [13].

No presente estudo, realizou-se o desenvolvimento de um nanofármaco, na categoria de Nanoemulsão, formulado à base de óleo de Copaíba com associações com Nanopartículas de Prata (Ag-NPs) e medicamentos antifúngicos convencionais como a Terbinafina e Itraconazol, buscando conhecer através de ensaios de toxicidade e antimicrobiano, sua atividade e efeitos através de estudos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo será abordado a patologia específica bem como o tratamento e fármacos de interesse. Em seguida, será detalhado o processo de síntese por Combustão líquida e desenvolvimento de Nanoemulsões.

2.1. Dermatofitoses

A pele humana compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas de tecidos: uma camada superior a epiderme; uma camada intermediária - a derme; e uma camada profunda - a hipoderme ou tecido celular subcutâneo [17]. É a barreira anatômica e fisiológica entre o organismo e o meio ambiente, promovendo proteção contra injúrias físicas, químicas e microbiológicas. É sensível ao calor, ao frio, à dor, ao prurido e à pressão [17; 18]. Os queratinócitos, presentes na camada córnea – a mais externa da epiderme (Figura 2), sintetizam grânulos lamelares, que terão importância na barreira de proteção oferecida pela epiderme [19].

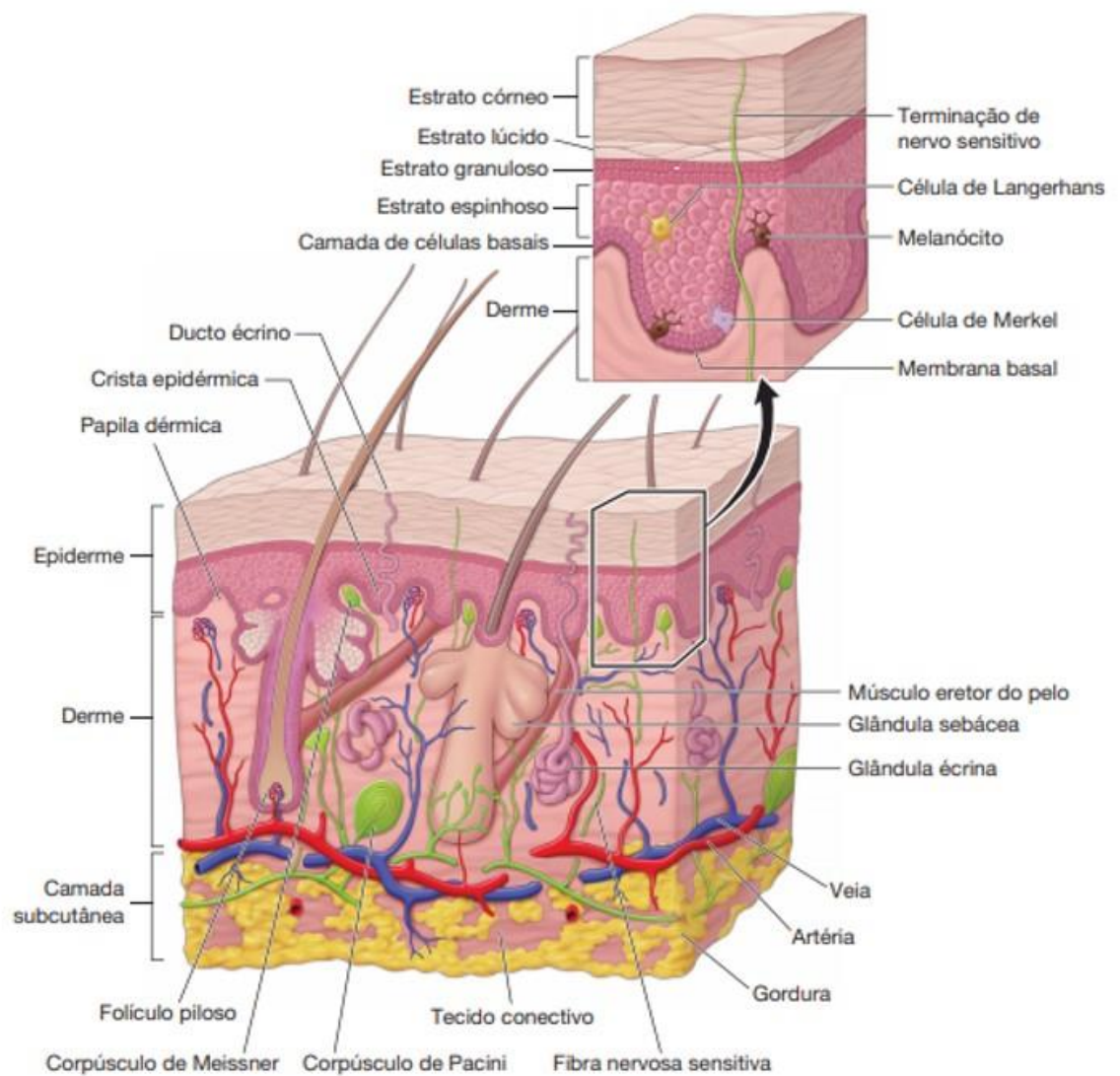


Figura 2: Estrutura da Pele [20].

A dermatofitose é uma doença de caráter contagioso causada por um grupo homogêneo de fungos patogênicos chamados dermatófitos, os quais apresentam marcada afinidade pela queratina da pele e são encontrados em todo mundo, sendo reconhecidas mais de trinta espécies [21]. A infecção afeta 40% da população mundial e representa 30% de todas as infecções micóticas cutâneas [22]. No Brasil, percebe-se que as medidas em saúde pública não dão o enfoque necessário para infecções fúngicas e isso gera um agravamento “invisível” de diversas infecções fúngicas, inclusive dermatofitoses, na camada mais vulnerável da população. Os agravantes são desde os diversos desconfortos de convívio social (como o estigma gerado pelas lesões) a qualidade de vida e longos tratamentos [23].

A propagação das dermatofitoses depende do contato direto ou indireto entre os hospedeiros infectados e não infectados [24; 25]. A infecção é iniciada pela inoculação de

conídios ou arthroconídios, que são estruturas fúngicas encontradas no ambiente e no tegumento, viáveis por muitos anos [26]. O sucesso desse processo infeccioso está relacionado na capacidade dos fungos aderirem ao tecido epitelial e superar os mecanismos de resistência do hospedeiro a exemplo da própria barreira cutânea, pH da pele e presença de ácidos graxo fungistáticos [26].

A doença pode ser transmitida de animal para animal, de animal para seres humanos, ou do solo para os animais e para os seres humanos [21; 27]. Portanto, são classificados de acordo com sua relação ecológica, podendo ser denominados, geofílico, zoofílico e antropofílico. As espécies de dermatófitos que são transmitidas entre humanos são as antropofílicas, sendo as outras consideradas como oportunistas, mas ainda podem causar lesões graves e de difícil tratamento [23].

Os dermatófitos, também, são classificados, sistematicamente, como pertencentes do Filo Ascomycota, da Classe Pezizomycotina, da Ordem Onygenales, e da Família Arthrodermataceae [23]. São classificados em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. O *Trichophyton* pode infectar os pêlos, a pele ou as unhas; o *Microsporum* usualmente envolve unicamente pêlos ou pele; o *Epidermophyton* afeta somente pele e unhas, neste caso, escamas de pele poderiam estar aderidas ao pelo [21]. Dessa forma, as Dermatofitoses são caracterizadas infecções superficiais, pois afetam somente pele, cabelos, unhas ou mucosas; e são chamadas sistêmicas, quando atingem regiões mais profundas do organismo [28].

Existem relatos que 90% das infecções crônicas são causadas por *Trichophyton rubrum* (Figura 3) [29] são, geralmente difíceis de tratar e estão associadas a recorrências após a interrupção da terapia antifúngica [30]. Vários motivos são aventados para explicar o aumento da incidência destas infecções nas últimas décadas, entre eles: o uso abusivo de antibióticos, drogas imunossupressoras e citostáticas, bem como o aparecimento de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), os quais constituem alvo para o desenvolvimento das dermatofitoses [31].



Figura 3: Imagem de *T. rubrum* em epiderme da bolsa escrotal de homem imunodeprimido, obtida por MEV [32].

A espécie *Trichophyton rubrum* é um fungo filamentosso queratinofílico (Figura 3). É considerado o dermatófito mais comum em humanos e normalmente coloniza as camadas superficiais da epiderme (estrato córneo), unhas e folículos capilares [33; 34]. São também conhecidas como Tinhas ou Tíneas e a manifestação clínica, normalmente, é diagnosticada por exames clínicos, identificando uma lesão eritematosa, escamosa, e com prurido intenso. As dermatofitoses podem se apresentar como lesões superficiais e crônicas, a depender do estado de saúde inicial do paciente [23] (Figura 4).

A colonização se inicia na camada córnea da epiderme, crescendo dicotomicamente, de maneira circular e centrífuga resultando, ao final de alguns dias, em uma lesão macroscópica [35].

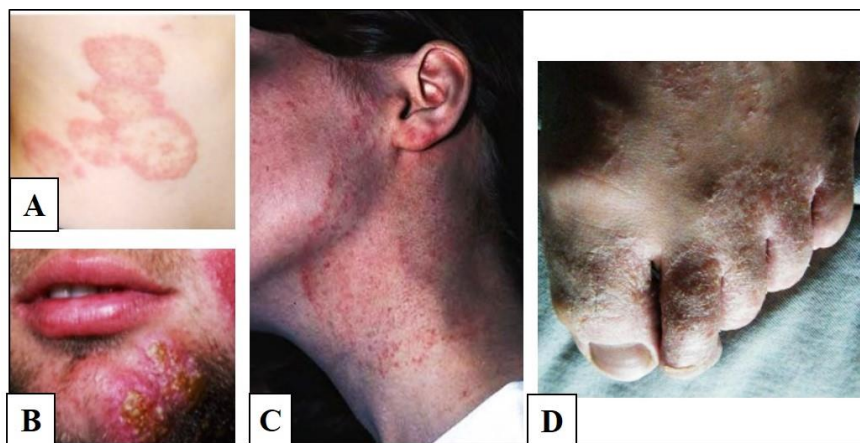


Figura 4: Manifestações clínicas das Dermatofitoses. A: *Tinea corporis*; B: *Tinea barbae*; C: *Tinea corporis*; D: *Tinea pedis*. Fonte: [23; 36] (adaptado).

No diagnóstico laboratorial das dermatofitoses, como em outras micoses, é realizada a colheita do material clínico, respeitando a questão do crescimento radial do fungo na lesão

[37]. Em pele e unhas o aspecto mais observado é o da presença de filamentos micelianos septados, de tamanho variável e que podem estar ramificados. É possível observar a presença de artroconídeos nos quais os filamentos micelianos separam-se fisicamente em nível dos septos e posteriormente os mesmos arredondam-se formando cadeias semelhantes a um colar de contas lesão [37].

Embora o dermatófito antropofílico e cosmopolita *Trichophyton rubrum* seja um dos fungos mais frequentemente isolados de infecções cutâneas, o conhecimento sobre os processos moleculares que governam sua patogenicidade ainda é escasso, além disso, os antifúngicos utilizados no tratamento das infecções agem sobre um limitado número de alvos celulares, apresentando vários efeitos colaterais [38].

2.2 Fármacos Antifúngicos

As Dermatofitoses podem ser tratadas topicamente, sistemicamente, ou associando-se ambas formas de tratamento, a depender do perfil de sensibilidade do fungo, o sítio acometido, a extensão da lesão, entre outros fatores [36].

Inúmeras drogas antifúngicas, como a anfotericina B, 5-fluorocitosina, azóis e equinocandinas, incluindo caspofungina e micafungina, surgiram devido ao aumento da resistência aos medicamentos, efeitos colaterais indesejáveis, alto risco de toxicidade e insuficiências na atividade antifúngica, o uso tem sido limitado [29]. O mesmo autor destaca que, dentre os medicamentos antifúngicos, os azóis (como o fluconazol, Itraconazol e Voriconazol) são antifúngicos mais utilizados devido ao seu alto índice terapêutico, entretanto, o Sertaconazol exibiu atividade fungicida e fungistática em ensaios clínicos randomizados [39]. Diante de situações quanto a resistência de patógenos humanos a medicamentos antifúngicos e problemas relacionados à toxicidade, surge a necessidade do aprimoramento dos agentes anti-micóticos convencionais, ampliando o espectro de ação e diminuindo efeitos colaterais limitantes a dose [10]. Quanto a questão de resistência do fungo, o teste rotineiro de sensibilidade aos antifúngicos não é realizado no caso de isolamento do dermatófitos de amostras clínicas e, com isso, é difícil definir se as recidivas comuns após a interrupção de uma terapia antifúngica, se devem a má adesão ao tratamento ou à infecção por cepas resistentes a antifúngicos [30].

O Itraconazol é um triazol (Figura 5) sintético usado na medicina humana e veterinária, funcionando como um agente nas membranas celulares dos fungos causando um

aumento na sua permeabilidade e permitindo o extravasamento do conteúdo celular [40; 41]. O mecanismo de ação baseia-se na capacidade de inibir a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula dos fungos. A consequência do bloqueio da síntese do ergosterol é um aumento da permeabilidade da membrana celular, desencadeando alterações morfológicas que resultam em necrose celular [42; 43]. Trata-se de um medicamento antifúngico pouco solúvel em água, entretanto, possui um amplo espectro de atividade contra uma variedade de patógenos que causam infecção oportunista em pacientes infectados pelo HIV [44; 45]. Apresenta, dentre outras características, basicidade fraca ($pK_a = 3,4$) que é virtualmente ionizado a pH baixo, com solubilidade em água extremamente baixa (cerca de 1 mg / mL em pH neutro e cerca de 4-6 μL em pH 1) [46; 45].

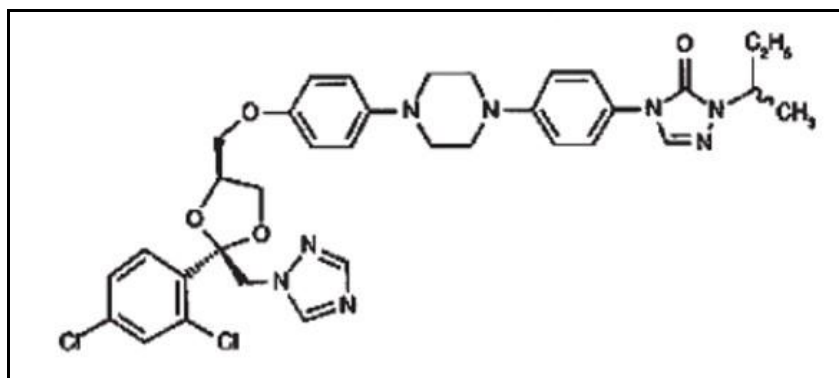


Figura 5: Estrutura Química do Itraconazol. [43]

A terbinafina é um antifúngico sintético da alilamina comumente usado em humanos e remédios veterinários, tendo como mecanismo de ação a inibição do esqualeno epoxidase, uma enzima essencial na biossíntese do ergosterol [41]. Com a síntese de ergosterol comprometida, ocorre a acumulação de níveis tóxicos de esqualeno na célula fúngica enfraquecendo a parede do fungo e levando a um aumento da permeabilidade celular [41; 47; 48].

Na ausência de terbinafina, o esqualeno epoxidase converte o esqualeno em 2,3-oxidosqualeno, que é então ciclizado para lanosterol por outras enzimas [49; 50]. Com isso, o lanosterol é convertido em colesterol e/ou ergosterol, a quantidade de formação de cada um depende da espécie celular [49; 50]. Fundamentalmente, a inibição da esqualeno epoxidase induzida pela terbinafina é qualitativamente e quantitativamente diferente entre células de fungos e mamíferos [50].

Devido a esses mecanismos, a terbinafina (Figura 6) tem efeitos fungistáticos e propriedades fungicidas e, através de estudos experimentais, possui também ações anticâncer

e antiangiogênicas em várias linhas celulares neoplásicas com propriedades de eliminação de radicais livres [41].

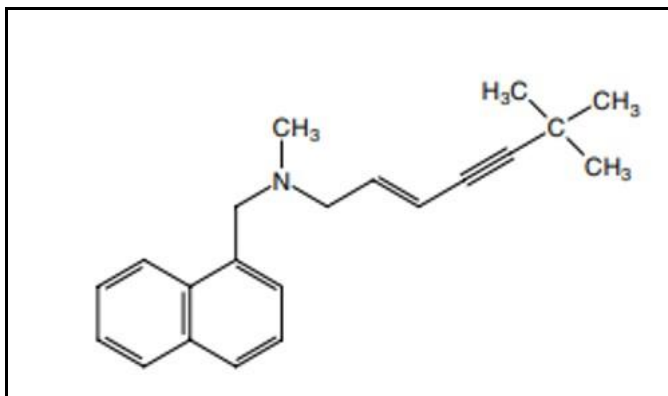


Figura 6: Estrutura Química da Terbinafina. [50]

A terbinafina é altamente eficaz contra dermatófitos veterinários mais comuns (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton metagrophytes*) e possui taxas de eficácia mais alta e menos taxa de recidiva do que aquelas observadas com Itraconazol no tratamento de dermatófitos [41; 51].

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é contínuo, porém ainda não se encontrou um medicamento completamente ideal em relação à eficácia, segurança e curtos períodos de tratamento [52; 53; 54]. Os diversos efeitos colaterais das drogas sistêmicas convencionais, como a hepatotoxicidade, têm sido incentivo para buscar opções de tratamento em produtos naturais de uso tópico [55].

2.3. Nanotecnologia: Nanofármacos

Na última década, um grande número de estudos tratou de estratégias de administração de medicamentos para síntese de fármacos pouco solúveis em água e lipofílicos, incluindo dispersões sólidas e formulações baseadas em nanopartículas, entretanto, as principais desvantagens de dispersão do sólido estão relacionadas à sua instabilidade [45], bem como a processos de recristalização da dispersão sólida com o potencial de deterioração da liberação e biodisponibilidade de medicamentos [56; 45].

A nanotecnologia foi estabelecida como uma alternativa promissora para aumentar a dissolução e a solubilidade de substâncias [57], pois, verificou-se que a nanoescala aumenta a biodisponibilidade do fármaco [58; 59].

As nanopartículas poliméricas tem sido extensivamente estudadas como portadoras de partículas nos campos farmacêuticos porque mostram prometer, como sistemas de administração de medicamentos e como resultado do seu tamanho subcelular, o aumento da absorção intestinal de medicamentos pouco solúveis em água [56; 45]. Além disso, as NPs permeiam mais facilmente os epitélios do que as micropartículas e fornecem uma liberação controlada dos medicamentos encapsulados [57].

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando produtos vegetais tradicionais, usados em etnomedicina, demonstraram atividade antifúngica promissora sem efeitos colaterais, especialmente quanto a óleos essenciais de plantas [60; 10]. Em um estudo conduzido por Baltazar *et al.* (2015), foi utilizado a curcumina nanoencapsulada contra *T. rubrum*, que demonstrou eficácia quanto a distribuição e solubilidade. Quando utilizado extratos de *Pothomorphe umbellata*, planta nativa brasileira, que apresenta na sua com posição sesquiterpenos e óleos essenciais, os resultados apresentaram propriedades antifúngicas [62]. As Ag-NPs demonstraram que a cepa ATCC MTA-4438, resistente à terbinafina, foi suscetível à exposição dessas nanopartículas, cujo mecanismo antifúngico de ação é diferente do fármaco comercial [63].

As nanoemulsões (NEs) podem apresentar atividades fungicidas, como a X8W60PC, que apresentou atividade contra leveduras e fungos filamentosos (Figura 7) com potencial para tratamento de uso tópico [13]. A aplicação com NEs de *P. latifolia* mostraram atividade antifúngica contra os dermatófitos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* quando associada a carvona e limoneno [64].

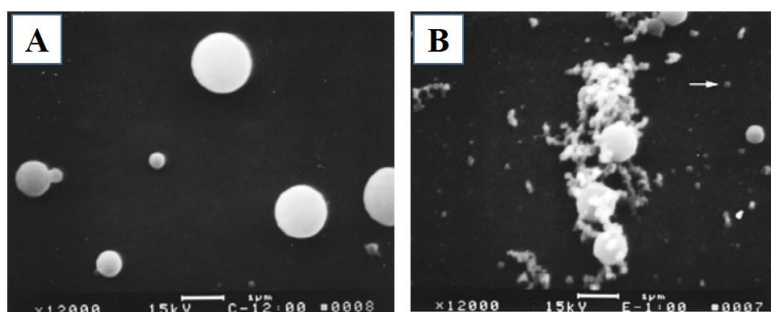


Figura 7: Microfotografias por MEV de *Candida albicans*, em A não tratadas com emulsão; em B dano celular causadas por tratamento com nanoemulsão. [13].

Embora a classe dos antifúngicos utilizados de forma convencional pareça numeroso, existe uma problemática quanto a resistência e efeitos colaterais, surgindo a necessidade de novos tipos de formas e formulações farmacêuticas para obtenção de melhores resultados.

2.4 Nanoemulsões (NEs)

As NEs são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, cujas gotículas encontram-se com tamanho médio inferior a 200 nm [65] sendo necessário para a estabilização da fase aquosa (água) e fase oleosa (óleo essencial), o uso de tensoativo (ou surfactantes), para a obtenção de amostras homogêneas e estáveis. Esses sistemas em escala nanométrica podem ser considerados uma derivação das Emulsões, Microemulsões ou Macroemulsões, tradicionalmente desenvolvidas pela área farmacêutica (Figura 8).

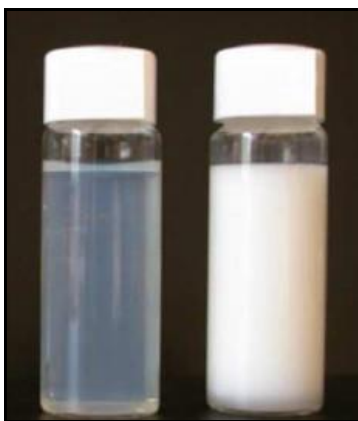


Figura 8: Comparação entre uma nanoemulsão (esquerda) e uma macroemulsão (direita) com diâmetros das gotículas de 35 nm e 1 μ m, respectivamente [66].

As NEs podem ser projetadas por seleção criteriosa do componente da fase oleosa para incorporar quantidades de fármacos de interesse (hidrofóbico) em seu núcleo de óleo e modificação na superfície das gotículas do óleo para melhorar a absorção do fármaco incorporado [67]. Trata-se de sistemas possuem baixa estabilidade termodinâmica, que é percebida através de referenciais relevantes como o tempo decorrido para a separação de fases e fenômenos relacionados, sendo classificadas como óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), sendo a primeira fase dispersa e a segunda contínua [68].

As emulsões ou NEs podem ser classificadas em óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e sistemas múltiplos (A/O/A ou O/A/O) (Figura 9). Quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas em fase contínua oleosa, denomina-se A/O, porém, quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas na fase aquosa, denomina-se O/A [69]. As emulsões múltiplas são

sistemas onde os dois tipos de emulsões existem simultaneamente, podendo assim ser do tipo A/O/A ou O/A/O, no qual a fase dispersa contém pequenas gotas de uma outra fase dispersa em seu interior, e esta segunda fase dispersa está fisicamente separada por uma fase dispersa de composição distinta [70].

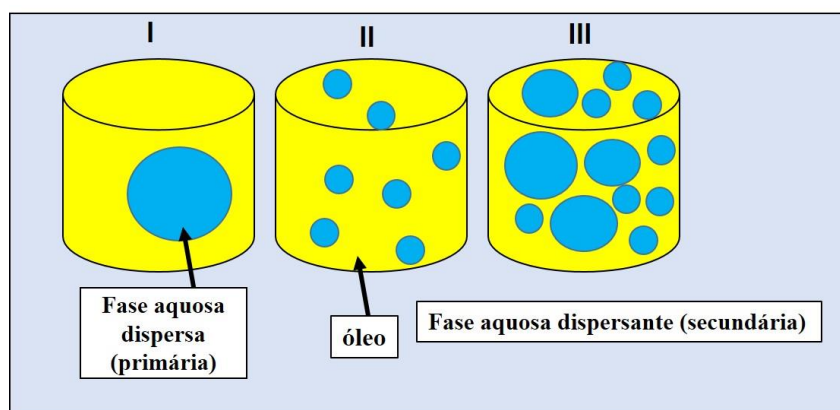


Figura 9: Morfologia dos tipos de NEs: A/O, O/A e sistemas múltiplos, segundo [71; 70; 72].

Foi relatado que as NEs tem ampla eficácia biocida e esporicida contra uma infinidade de microorganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, interrompendo suas membranas externas [73]. Em estudos realizados por [74], onde foram testados o óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorfii*) e a NEs do mesmo, houve a inibição de fungos do gênero *Paracoccidioides* e não foi observada a citotoxicidade ou efeito hemolítico. Esse efeito é constatado porque ocorre uma interação das NEs com a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, a energia armazenada na emulsão óleo e surfactantes são liberadas e desestabiliza a membrana lipídica, seja de bactéria ou fungos, daí sua atividade antimicrobiana [75]. O mesmo autor relata, que a atividade antimicrobiana das NEs é inespecífica, ao contrário dos antibióticos, permitindo atividade de amplo espectro enquanto limitando a capacidade de geração de resistência.

Devido sua estabilidade a longo prazo, facilidade de preparação (emulsificação espontânea entre outras) e alta solubilização do fármaco, esta categoria de nanofármaco (NEs) torna-se promissora como uma ferramenta de administração de medicamentos [76].

2.5 Obtenção e composição de NEs

Os métodos de emulsificação extremos podem ser usados para produzir dispersões em nanoescala de gotículas de um líquido em um outro líquido imiscível, resultando em sistemas metaestáveis que podem persistir por muitos meses ou anos devido a presença de um agente surfactante estabilizador que inibi a coalescência das gotículas [77]. Para que isso ocorra, são misturadas quantidades apropriadas de óleo, água, surfactantes e/ou co-surfactantes (Figura 10) [76].

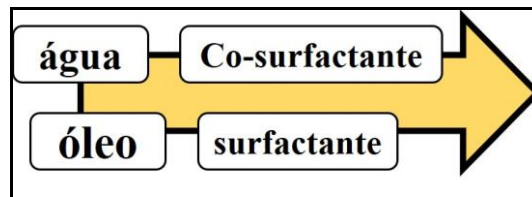


Figura 10: Componentes da Nanoemulsão (adaptado). [78].

Para sua preparação, várias técnicas são utilizadas, como a aplicação de métodos de alta e baixa energia, incluindo homogeneização a alta pressão, ultra-som, temperatura de inversão de fase e emulsão por ponto de inversão, bem como abordagens recentemente desenvolvidas como o método de rebentamento de bolhas, misturadores de alto cisalhamento [78; 79] (Figura 11). Diante disso, as NEs são uma criação sintética que provavelmente não existiria de outra forma, exceto pela produção por seres humanos [77].

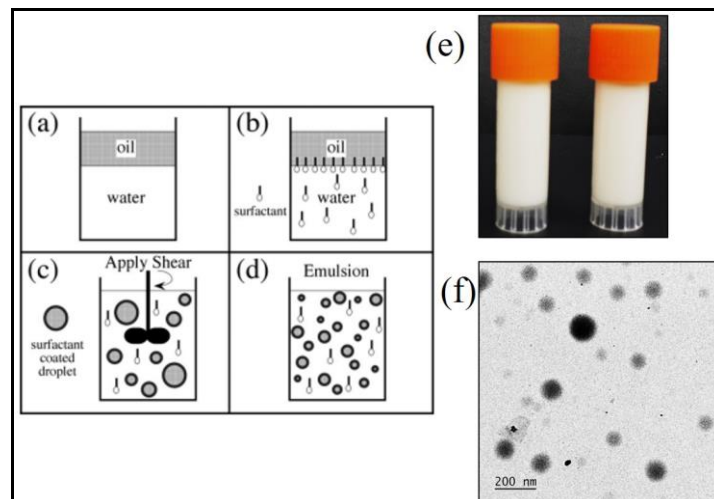


Figura 11: Processo de cisalhamento (a)/ (b)/ (c)/ (d); NE estável (e); fotomicrografia NE (f). [77] adaptado.

Para garantir a estabilidade das NEs, é necessária a observação de alguns parâmetros como a temperatura, homogeneização, pressão e número de ciclos que podem afetar nas propriedades físico-químicas assim como o modo de incorporação do medicamento lipofílico na fase oleosa afetam sua estabilidade [80; 81]. A manifestação mais comumente relatada de deteriorização das NEs é a formação de um anel esbranquiçado ou mancha brilhante de óleo ao redor do gargalo do recipiente [78; 82]. Trata-se de resultados de uma variedade de mecanismos físico-químicos que ocorrem nas emulsões: cremação, floculação, coalescência e Ostwald [78].

2.6 Nanoemulsões associadas a Antifúngicos convencionais: Nanomedicamentos X Alopáticos

O desenvolvimento de nanodrogas ainda é escasso, apesar de oferecer várias vantagens farmacocinéticas, como a administração específica de medicamentos, alta estabilidade metabólica, alta permeabilidade de membrana, biodisponibilidade aprimorada de longa duração [83]. Já existem vários tipos de Nano-Sistemas descrito na literatura para administração em diversas vias, como: ciclodextrinas, lipossomas, micro ou nanopartícula poliméricas, micro ou nanopartículas lipídicas sólidas, micro ou nanopartículas magnéticas e micro ou NEs contendo óleos vegetais [84; 85; 86].

As NEs associadas à óleo e a medicamentos antifúngicos convencionais podem ser uma alternativa para o tratamento de micoses superficiais. Para [45], as NEs preparadas com simples homogeneização associadas a Itraconazol apresentaram-se estáveis e podem ser formuladas como sistema de administração de medicamentos auto-emulsificantes. Nos últimos anos, os sistemas auto-emulsificantes de administração de medicamentos têm sido utilizados para aumentar a biodisponibilidade oral de medicamentos pouco solúveis em água, especialmente de alta lipofilicidade [87].

O óleo de copaíba é extraído das árvores de *Copaifera L.* (Leguminosae), um gênero que cresce na região da Floresta Amazônica e desde a antiguidade tem sido utilizada popularmente para promover a cicatrização de tecidos, anti-inflamatório e antimicrobiano [88; 89]. O óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne, apresentou resultados satisfatórios de ação antimicrobiana para *aspergilose* ou *candidíase* [90]. Este óleo é basicamente composto por sesquiterpenos e diterpenos, sendo o β -cariofileno, seguido de α -humuleno, α bergamoteno e δ -cadineno os principais sesquiterpenos (Figura 12) [91; 89]

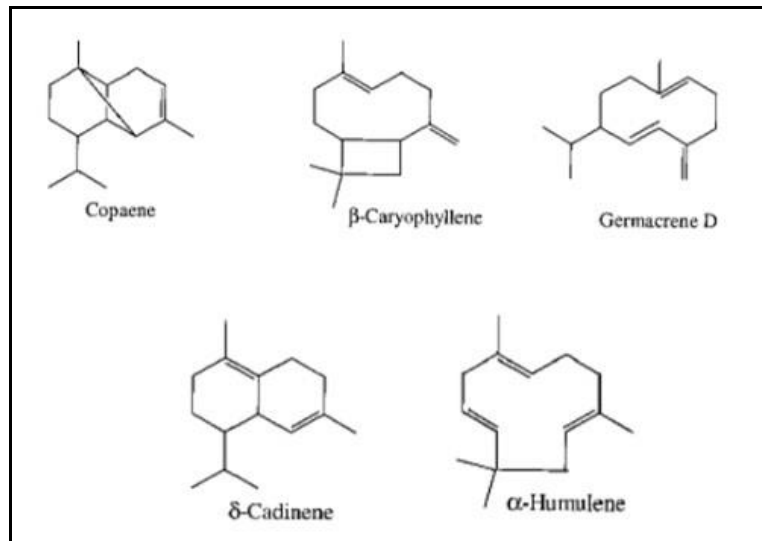


Figura 12: Alguns sesquiterpenos encontrados no gênero *Copaifera*. [92]

Através da análise por cromatografia gasosa, é possível observar sesquiterpenos (entre 8 e 13 minutos) e diterpenos (entre 20 e 26 minutos). A concentração e a natureza dos mesmos podem variar, mas estas duas classes de produtos naturais, e mais nenhuma outra, devem estar sempre presentes nos óleos de copaíba (Figura 13) [91; 93]. Estudos realizados com óleo de *Copaifera multijuga* mostraram que, a fração rica em hidrocarbonetos apresenta maior atividade antiinflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos [91; 93].

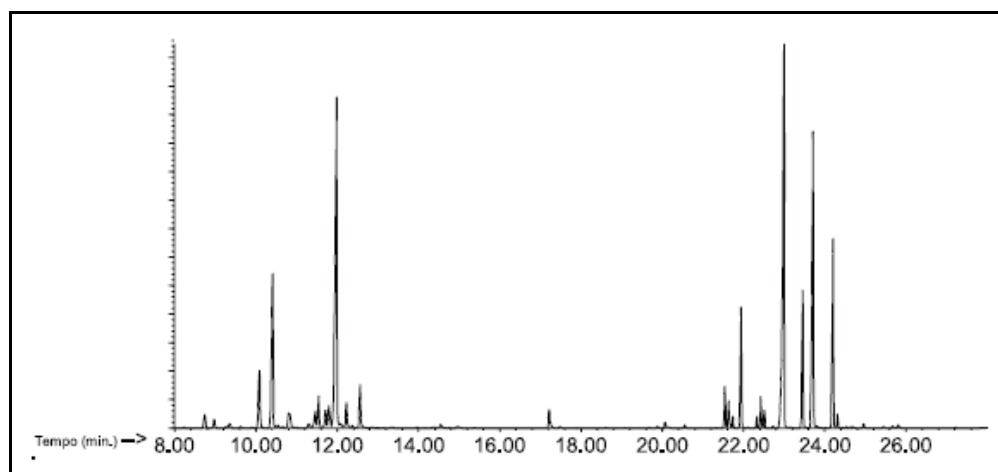


Figura 13: Cromatograma típico de óleo de copaíba. [91].

Embora a natureza insolúvel em água do óleo de Copaíba possa conferir uma sensação desagradável quando usado topicamente, o desenvolvimento de uma forma de dosagem tópica

pode conferir benefícios com relação à estabilização do óleo e penetração através da pele [94]. A nanoemulsão de óleo de copaíba (*C. multijulga* Hayne) é uma estratégia promissora para tratar a pele inflamada localmente ou outras condições da pele como infecções por fungos [94].

2.7 Propriedades terapêuticas do O.C.O (*C. multijulga* Hayne) e nanoformulações

As formulações de microemulsões elaboradas com óleo de copaíba (*C. multijulga* Hayne), foram comprovadamente eficazes como atividade anti-inflamatórias, apresentando efeito mais rápido e efetivo [95]. Em contrapartida, microemulsões desenvolvidas para uso tópico, com a mesma espécie do óleo, apresentou atividades antimicrobianas [96]. As nanoemulsões à base de óleo de copaíba foram eficazes, favorecendo o efeito anti-inflamatório em duas espécies de leishmanias, *L. major* e *L. donovani* na modalidade de uso tópico [97].

Estudos de atividade antibacteriana mostraram maiores atividades bactericida e bacteriostática do óleo de *Copaifera multijuga*, frente a *Streptococcus mutans*, enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida e a resina apresentou-se apenas bacteriostática [98]. A ação do mesmo óleo, foi eficaz para inibição do crescimento de duas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* [90].

Os efeitos adversos dos antifúngicos como das drogas azólicas [99], as limitações do arsenal terapêutico devido às características físico-químicas dos antifúngicos, que precisam ser altamente lipossolúveis para penetrar a parede do fungo; as propriedades farmacocinéticas, especialmente relacionadas a questões de metabolismo e toxicidade [100] e as propriedades farmacodinâmicas, uma vez que as diferenças citológicas entre as células eucarióticas dos fungos e a dos hospedeiros são pequenas [101; 102], são efeitos negativos da ação dos antimicóticos.

Como podemos constatar, os medicamentos antifúngicos para infecções utilizados atualmente não satisfazem a necessidade médica completamente, devido a problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos agentes disponíveis [103].

Diante disso, novas estratégias terapêuticas estão surgindo, modificando a composição, forma farmacêutica e via de administração dos antifúngicos. A nanotecnologia

apresenta um grande avanço científico na síntese e aplicação de nanopartículas para fins terapêuticos [104].

A vetorização de fármacos, baseada na teoria de Paul Ehrlich sobre a capacidade de minúsculas partículas (nanopartículas) em carrear moléculas ativas aos sítios específicos de ação, tem sido considerada uma das principais linhas da pesquisa biofarmacêutica das últimas décadas, fazendo parte de uma grande área que rapidamente emergiu no Brasil e no mundo [105]. Essas nanoestruturas podem ser consideradas poderosas ferramentas para o tratamento de infecções devido a capacidade de entrarem na célula, por meio de endocitose, o que poderia beneficiar a liberação de medicamentos em meio intracelular [106].

As nanopartículas vêm sendo produzidas e utilizadas em uma ampla gama de produtos em todo o mundo, incluindo as Ag-NPs e outros compostos, como óxido nítrico e quitosana, promissores para o tratamento de feridas [107; 108]. As Ag-NPs mostram-se bastante eficientes devido a sua atividade catalítica, onde ocorre uma grande liberação de íons, fazendo com que os íons penetrem diretamente na membrana celular, causando danos ao processo de respiração celular e na permeabilidade [109; 110].

A prata sempre foi usada na forma de prata metálica, nitrato de prata, sulfadiazina de prata para o tratamento de feridas, queimaduras e várias infecções bacterianas [108]. As Ag-NPs agem no processo de permeabilidade e respiração celular na membrana das bactérias, assim como podem conectar-se ao fósforo e ao enxofre presentes na estrutura do DNA, impedindo a divisão celular [109].

2.8 Síntese de Ag-NPs

Existem uma variedade de procedimentos químicos e físicos que podem ser utilizados para a síntese de NPs metálicas [108], entretanto, estes métodos possuem vários inconvenientes, incluindo a utilização de solventes tóxicos, caros e geração de subprodutos, inviabilizando a obtenção ou utilização das NPs em alguns casos [111].

Conforme destacado por [110], há duas maneiras de introduzir essas NPs, sendo a primeira através do uso de substratos impregnados previamente com soluções coloidais e NPs predeterminadas; a segunda forma é o uso de soluções com sal de prata em tratamentos com agentes que reduzem esse elemento, denominado de catalisador redutor tendo como exemplo, a ureia.

A utilização de solução precursora com íons de prata, um agente redutor associado a um agente estabilizante, são alternativas mais usuais para controlar o crescimento das Ag-NPs metálicas [110; 112], A força do agente redutor influência na obtenção das NPs, bem como o pH do meio reacional, sendo que quanto mais forte o agente redutor em meio ácido, maior a tendência a formar aglomerados, conseqüentemente partículas maiores, enquanto em meio mais alcalino tende a formação de partículas menores [104; 113].

As Ag-NPs são formadas a partir de íons Ag^+ , aos quais são responsáveis pela atividade antimicrobiana, porém, não se sabe ao certo o mecanismo de ação antimicrobiana tem relação, apenas, com a liberação de íons ou se as próprias Ag-NPs proporcionam uma toxicidade específica [110; 114].

2.9 Ensaios Antimicrobianos

O uso constante ou a interrupção do uso de anti-micóticos pode provocar a resistência de fungos patogênicos, desencadeando na busca de novos agentes antifúngicos que sejam mais eficazes. O estudo da resistência bacteriana, geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos [115; 116; 117]. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste [118]. Esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI) [119].

Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos ou óleos, diferentes métodos podem ser utilizados, sendo os seguintes os mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição, os quais são realizados em caldo [120]. Os métodos de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano [120; 121].

Através dos métodos de difusão em ágar, é possível avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica utilizando microrganismos patogênicos. Estudos realizados por Deus (2011) [122], apresentaram boa atividade do óleo-resina de copaíba contra cepas de *Candida parapsilosis*. O óleo de copaíba também apresentou atividades promissoras, apresentando potencial de inibição de crescimento contra bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,

Escherichia coli ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [123]. O óleo de copaíba apresentou eficiência ao ser utilizado em experimento com isolados de *Staphylococcus aureus*, cuja capacidade de inibição sobre duas amostras resistentes a antibióticos foi comprovada [124]. Acredita-se que o efeito antimicrobiano deste óleo na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas é exercido pela maioria deles, modificando a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, interrompendo os processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, dentre outros processos que resultam na morte da bactéria [125]. Assim considerando estas informações pode-se avaliar que o potencial do óleo resina da copaíba apresenta uma atividade antimicrobiana significativa para diversos microrganismos patógenos ao homem [126].

Este estudo terá como um dos objetivos, verificar *in vitro* a atividade antimicrobiana do óleo resina de copaíba *Copaifera Multijulga*, as nanoemulsões formuladas com ele e associadas a Ag-NPs e medicamentos antifúngicos, Itraconazol e Terbinafina. Para tanto, foram testados pela avaliação do mecanismo de sensibilidade e resistência, 3 espécies de fungos leveduriformes, 1 espécie de fungo filamentoso e 4 espécies de bactérias utilizando para isso o método de difusão em poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3. JUSTIFICATIVA

Na literatura, encontramos poucas formas farmacêuticas convencionais para tratamento tópico das Dermatofitoses. A Terbinafina e Itraconazol são medicamentos antifúngicos comercializados na forma tópica e enteral, entretanto, quando administrados da forma oral causam efeitos colaterais dentre eles náuseas, vômitos, dores, desconforto abdominal, sintomas comumente associados ao sistema gastrointestinal. Os fármacos mencionados são metabolizados no fígado e suas concentrações em níveis hepáticos, podem ser grandes e com isso a monitoração das enzimas transaminases (AST e ALT) do fígado é necessária, pois em níveis elevados indica ocorrência de lesão hepática. Devido a essas situações o desenvolvimento e utilização de sistemas de distribuição de drogas, como as NEs, tem surgido como uma ferramenta bastante conveniente, pois apresenta características que atenuam esses efeitos colaterais. As NEs podem ser sintetizadas como carreadores hidrofóbicos e isso possibilita sua dispersão em meio aquoso por um período maior no organismo e, além disso, proporciona a liberação de fármacos lipofílicos (como antifúngicos). Outra característica é o aumento da biodisponibilidade do fármaco de interesse no organismo, associando a diminuição dos efeitos colaterais proporcionados por eles. Com isso, o estudo teve como objetivo avaliar o comportamento *in vitro* de NEs produzidas com Terbinafina e Itraconazol através de testes antimicrobianos com bactérias e fungos patogênicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- O presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de uma Nanoemulsão a base de óleo de Copaíba associada a antifúngicos para avaliar sua atividade e citotoxicidade em fungo dermatófito.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas Prata (Ag-NPs) para facilitar a absorção do fármaco em meio intracelular;
- Caracterizar as Ag-NPs quanto as propriedades morfológicas (MET, MEV), Térmicas (TGA), difratométricas (DRX) e espectroscópica (FTIR) das Ag-NPs produzidas, visando identificar suas propriedades.
- Desenvolver nanoemulsão O/A à base de óleo de copaíba associadas a nanopartículas e fármacos antifúngicos;
- Conhecer as características de dispersão coloidal das nanoformulações através de medidas do Potencial Zeta e comportamentos de estabilidade por meios de testes físico-químicos;
- Avaliar da atividade antimicrobiana das NEs produzidas, contra os microorganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Tricophyton rubum*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e os procedimentos experimentais empregados na síntese das Ag-NPs e as descrições de cada técnica utilizadas nas caracterizações dos Nanomateriais produzidos serão descritos nesta sessão.

5.1. Reagentes e Materiais

Para a síntese das NPs, NEs e ensaios foram utilizados reagentes, materiais de experimento, material biológico e equipamentos laboratoriais descritos na tabela 2 a seguir. As sementes de *Lactuca sativa* foram obtidos comercialmente. As colônias de fungos *T. rubrum* e espécies de cândidas e bactérias, cedidas pelo CEPEM/RO e REDE BIONORTE/AC, respectivamente.

Tabela 2: Reagentes e materiais utilizados na síntese de Ag-NPs e formulações das NEs.

REAGENTES	MATERIAL BIOLÓGICO	UTENSÍLIOS DE LABORATÓRIO	EQUIPAMENTOS EXPERIMENTAIS
Nitrato de Prata	Óleo de Copaíba	Placa de Petri	Micro-ondas
Ureia	Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	Papel filtro	Capela de Fluxo laminar
Tween 80	<u>Meio de culturas das estirpes:</u>	Pinça instrumental	Autoclave
Polietilenoglicol	<i>Escherichia coli</i>	Fita adesiva	Microscópio de luz
Itraconazol	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Copos descartáveis	Balança analítica
Terbinafina	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Espátula	ZetaSizer Nano- ZS90
Água destilada	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cadinho/ pistilo	MET
álcool	<i>Candida albicans</i>	Peneira	MEV
Ágar Mueller Hinton	<i>Candida parapsilosis</i>	Tubo falcon 50 ml	TGA
Meio Dextrose Sabouraud	<i>Candida tropicalis</i>	Tubo Falcon 15 mL	DRX
NaCl	<i>Tricophyton rubrum</i>	Erlemeyer	FTIR
		Alça de Platina	Homogeneizador hélice (Ultra Turrax)
		Béquer 500mL/ 1L	Centrífuga Hitachi
			Condutivímetro
			pHmetro
			Termômetro de mercúrio

5.2 Planejamento Experimental

5.2.1 Preparo das Nanopartículas

A síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), dentre outras metálicas, pode ser realizada por diversas metodologias, que proporcionam a produção de partículas com diferentes tamanhos, dispersão, estabilidade e morfologia [127]. O método de reação por combustão vem se destacando nos últimos anos, devido principalmente à facilidade de sua aplicação, ao custo relativamente baixo, ao controle da homogeneidade química, por requerer poucas etapas e curto tempo de duração [128; 129]. O processo de síntese de reação por combustão de pós utilizando-se a energia de micro-ondas é fundamentalmente diferente do processo convencional com relação às condições dos mecanismos de aquecimento [129].

A prata pode ser reduzida de seu nitrato por uma gama de substâncias orgânicas como álcoois, carboidratos, ácido tartárico, ácido ascórbico, etc. Os métodos de redução podem variar tanto do tipo do agente redutor como da quantidade e concentração destes, bem como a temperatura de reação, velocidade de agitação e duração do processo de redução [130].

A composição inicial da solução foi baseada na valência total dos reagentes oxidantes e redutores utilizando conceitos da química dos propelentes e explosivos de forma que foi estabelecida a estequiometria da fase de interesse [131]. Foram realizadas o balanceamento das equações utilizando os sais de Nitrato de Prata e ureia para obtenção de 3 tipos de amostras a serem estudadas, a rica em catalisador (+25%), pobre em catalisador (-25%) e a equação balanceada (EB) (Equação 1). Primeiramente foi obtida uma solução com a associação dos sais e, posteriormente, a queima assistida em micro-ondas por aproximadamente 5 minutos (Figura 14). A ureia atua na síntese como agente redutor dos cátions Ag^+ em solução.

Equação 1:



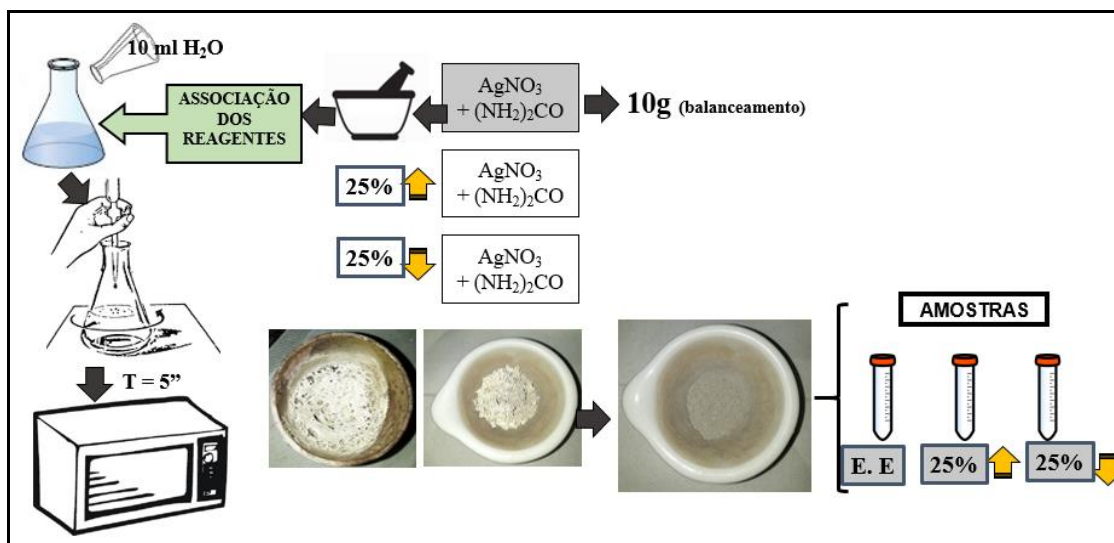


Figura 14: Procedimento simplificado da síntese de NPs por combustão líquida assistida em micro-ondas. Fonte do autor.

5.2.2 Técnicas de Caracterização aplicadas às Nanopartículas

As nanopartículas e nano formulações foram caracterizadas por diferentes técnicas, visando uma melhor compreensão das nanoestruturas sintetizadas.

- Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)

A principal utilidade da espectroscopia FTIR na caracterização de NPs metálicas é a detecção de espécies que interagem com a superfície das partículas [132]. Isso se dá, devido ao fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (são denominados de níveis vibracionais), esses níveis de vibração depende de fatores como, a geometria molecular, massas dos átomos, e acoplamento de vibrações [133]. Se a molécula receber radiação eletromagnética com a mesma energia de uma dessas vibrações, a luz será absorvida somente se a molécula sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração [133].

As Ag-NPs foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho visando identificar a presença de nitrato de prata na solução, dessa forma, monitorando as bandas características da solução e ligações formadas. As medidas de FTIR foram realizadas no LAMUTA da UFMT.

- Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG)

O conhecimento das propriedades térmicas pode levar à melhora de processos de moldagem, transporte, conservação e até melhorar as aplicações de determinados compostos e materiais, já que mudanças térmicas e o conhecimento dos limites de temperaturas podem comprometer suas propriedades [134].

A TGA é uma técnica de análise térmica destrutiva que mede a variação de massa de uma amostra em função do aumento da temperatura, com uma taxa de aquecimento constante e em uma atmosfera controlada [135]. A termogravimetria derivada (DTG) é definida como a técnica que fornece a derivada primeira da curva termogravimétrica, em função do tempo ou da temperatura [136]. As curvas termogravimétricas TG/DTG das amostras foram obtidas no intervalo de 50-500°C, atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹), utilizando uma termobalança e cadinhos de platina. As medidas foram realizadas no LAMUTA da UFMT.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por dispersão de energia (EDS)

Através da microscopia eletrônica de varredura, a imagem é formada a partir de feixes de elétrons, os mesmos são refratados por meio de lentes eletrônicas em um sistema de alto vácuo, interagindo com a matéria [137]. No MEV os elétrons varrem a superfície do material a ser analisado, resultando em uma imagem topográfica, tridimensional, com grande quantidade de detalhes [138].

Para análise da morfologia das NPs-Ag e nano formulações, estas foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q. Após recobrir os *stabs* com fita carbono, uma gota da amostra foi adicionada sob a mesma e reservada para secagem por 24 h em temperatura ambiente. É necessário que as amostras estejam secas devido à aplicação do vácuo. As amostras foram analisadas pelo microscópio de varredura empregando-se voltagem de 20kv. Neste estudo utilizou-se a técnica de espectroscopia por dispersão de energia (EDS) para realizar uma análise semi-qualitativa da distribuição dos elementos nas nanopartículas de prata funcionalizadas ou não.

As amostras foram examinadas e fotografadas através do Microscópio de Varredura JEOL, modelo JSM-7001F, em condições de vácuo de 3,6 x 10⁻⁴Pa, no Laboratório de Microscopia da UnB.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu visualizar a distribuição de tamanho de partícula [126]. Amostras de 10 μL foram diluídas em 90 μL de água destilada e homogeneizadas em vótex por aproximadamente 5 minutos. Após recobrir grades com *formwar*, adicionou-se o material e reservou para secagem a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período as amostras foram analisadas e fotografadas em MET, modelo JEM-2100, equipado com EDS, Thermo Scientific, no Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da UnB – campus Brasília.

- Espectroscopia de Raios-X (DRX)

A difração de raios-X é uma técnica empregada para análise de partículas (na forma de pó) apresentando-se como uma das principais ferramentas na identificação das fases presentes em materiais policristalinos [127]. A identificação do nanomaterial é realizada comparando os resultados obtidos no difratograma e dados registrados na literatura. A técnica fornece informações referentes a estrutura cristalina, constante de rede e diâmetro médio da nanopartícula sendo a estimativa do diâmetro médio, obtida a partir da largura de linha corrigida a meio altura do pico de reflexão mais intenso, usando a relação de Scherrer [127].

5.2.3 Preparo das Nanoemulsões

- Obtenção do Óleo de Copaíba

O óleo foi extraído da Reserva Biológica do Jaru (REBio) localizada interior de Rondônia, devidamente comunicado e autorizado pelo Instituto Chico Mendes-ICMBIO (em anexo). Para obtenção do óleo, foi usado trado manual de 7/8 polegada de diâmetro e 1,0 m de comprimento. A árvore foi perfurada à altura de 60 a 70 cm do chão, até o centro do caule (20 a 50 cm de profundidade no tronco, conforme o diâmetro da árvore), com pequeno declive para escoamento e, após a coleta, todas as amostras foram armazenadas em frascos âmbar à temperatura de 25 °C e fora do alcance de luz [28]. Foram obtidos aproximadamente 2 litros óleo da espécie de Copaíba (*Copaifera multijulga*), usada na fase oleosa para obtenção das nanoformulações (Figura 15).



Figura 15: Processo de extração do óleo de Copaíba. Fonte do autor.

- Obtenção das Nanoemulsões

Foram desenvolvidas nanoemulsões associadas e não associadas a nanopartículas e medicamentos antifúngicos alopáticos caracterizando dessa forma NEs com 2 e 3 fases, sendo elas: Fase 1 (Fase oleosa), Fase 2 (Fase aquosa) e Fase 3 (Fase complementar). Primeiramente, a fase oleosa consistindo de óleo de copaíba, a fase aquosa (água destilada) e fase complementar constituídas por Ag-NPs, aditivo e antifúngicos convencionais. Para a formação do sistema emulsionado, adicionaram-se as fases o tensoativo Hidrofílico Tween 80 (*Polyssorbate 80*) e como polímero hidrofílico não iônico, o polietilenoglicol (*Propylene glycol*) que possui propriedades umectantes. As formulações de Nanoemulsões foram desenvolvidas baseadas no método utilizado por [139;140;141; 142]. A fase oleosa foi agitada magneticamente por um período de 15 minutos e, após esse período, a fase aquosa e tensoativo foram adicionados manualmente a primeira fase e mantida a homogeneização mecânica por 30 minutos, utilizando-se um processador ultra-sônico e agitador Turrax. O valor de amplitude usada no processador ultra-sônico foi de 35%, no tempo de 10 minutos e o gradiente de velocidade usado no agitador foi de 18500 a 30000 rpm, por 10 minutos.

Considerou-se para a produção das NEs o método Ponto de Inversão de Emulsão que estabelece a razão por meio da concentração de óleo e tensoativo adicionado para formulação [136]. A composição quantitativa das Nanoformulações preparadas não será apresentada neste trabalho, em função de patente que se encontra em fase de elaboração. As proporções do tensoativo variou entre 1,0 a 25%, a quantidade de água entre 65 a 90% e a Fase 3 representadas pelas Ag-NPs e medicamentos alopáticos.

5.2.4 Técnicas de Caracterização aplicadas das Nanoemulsões

Fenômenos de instabilidade de sistemas emulsionados como agregação, floculação e coalescência podem ser acompanhados através da evolução do diâmetro médio, bem como da distribuição do tamanho de gotícula [140]. Foram realizadas avaliações físico-químicas por meio de análises macroscópicas, determinação do pH, condutividade, teste de centrifugação, estresse térmico, Potencial Zeta, índice de polidispersividade (PDI), MET, MEV e microscopia de luz descritas a seguir.

- Avaliações Físico-químicas

Análise Macroscópica

As características observadas consistem em avaliar a alteração de cor, presença de sedimentação e coalescência das amostras estudadas.

Determinação do PH

O pH foi obtido diretamente nas formulações com auxílio de um Peagômetro (Digimed) logo após a síntese e 24 horas posterior, seguindo a metodologia proposta por [141], onde foram preparadas diluições 1:10 de cada amostra pesando 1,0 g da nanoemulsão e 9,0g de água destilada.

Determinação da Condutividade

A condutividade foi medida após 24h da manipulação, utilizando um condutivímetro (modelo PHT-026). As medidas foram realizadas à temperatura de 25°C [141].

Teste de Centrifugação

Todas as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação onde, cinco gramas (5,0g) de cada amostra das nanoemulsões foram pesadas e centrifugadas aos ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm durante 15 minutos em cada rotação, e em temperatura ambiente controlada de 25°C [141].

Estresse Térmico

As análises de estresse térmica obedeceram ao protocolo utilizado por [142; 143], onde 5g das amostras formuladas foram adicionadas em tubos de ensaio de vidro e submetidas em banho termostaticado na faixa de temperatura de 40°C a 80°C, variando a temperatura em 5°C a cada 30 minutos. As avaliações macroscópicas foram realizadas visualmente ao final de cada ciclo de 30 minutos a fim de detectar fenômenos de instabilidade como cremação ou coalescência.

- **Potencial Zeta**

Quase todos os materiais particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície [134]. O potencial zeta é a função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente sendo um indicador útil da carga de superfície, podendo ser usado para prever e controlar a estabilidade de soluções ou dispersões coloidais [135]. Esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, que se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas, e com a estabilidade da suspensão, com isso, quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, e essa força supera a tendência natural à agregação [126]. O valor ideal deve ser maior ou igual a +/- 30mV.

As amostras foram diluídas de 20µL da amostra em 980µL de água destilada, mantidas em temperatura ambiente, transferidas para *ependorfs* de 1,5 mL. As soluções foram homogeneizadas em banho ultrassônico por 5 minutos e então encaminhadas para análise do Potencial Zeta, (ZetaSizer Nano- ZS90) no Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB.

- **Tamanho das partículas e o índice de polidispersividade**

O tamanho médio das nanopartículas e a distribuição de tamanho da suspensão coloidal ou índice de polidispersão (PDI) foram determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, “Dynamic light scattering” (DLS). Para realizar a caracterização dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanho foi utilizado um equipamento modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern). Esta técnica baseia-se no fato de que as partículas se movem aleatoriamente sob o impacto das moléculas do solvente sobre a sua superfície [136]. A frequência e a amplitude deste movimento, denominado browniano, é dependente do

tamanho da partícula e da viscosidade do solvente, ou seja, quanto menor a partícula, maior será a frequência do movimento browniano numa amplitude relativamente importante [136]. Os valores do PDI variam entre 0,00 e superiores a 0,70 como demonstrado na tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Valores de referência para PDI [136].

PDI	Características
0,00 a 0,05	Usualmente, medidas somente encontradas com padrões de látex ou partículas propositalmente produzidas como monodispersas.
0,05 a 0,08	Amostra quase monodispersa.
0,08 a 0,70	Faixa de polidispersividade média.
> 0,70	Amostra muito polidispersa; deve-se tomar cuidado na interpretação dos resultados, pois a amostra pode não ser adequada para a técnica DLS (pode haver quantidade significativa de partículas maiores, por exemplo.)

- Análise Nanoestrutural realizadas em MET e MEV

A análise morfológica das nanoestruturas sintetizadas puras e associadas em nanoformulações foram realizadas por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV. A amostra foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em água para nanopartículas e 0,3 mg/mL em água destilada para nanoformulações.

Com o auxílio de uma pipeta, a amostra foi colocada sob a tela de cobre *mesh* e fixada. Após um período de 24 horas de secagem, o material foi analisado em MET (Jeol® 1011C Japão). Para a obtenção das micrografias em MEV, utilizou-se *stabs* de cobre cobertos com fita carbono. Uma gota da amostra foi adicionada na superfície dos *stabs* recobertos e após 24 horas de secagem, o material foi analisado sem precisar de metalização.

- Microscopia De luz

Foram realizadas avaliações por microscopia de luz das nanoformulações para observar a presença de glóbulos e homogeneidade da amostra. Foi utilizado um Microscópio de luz binocular da marca Leica DM 750 com objetivas fluorescentes.

5.2.5 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana de extratos ou óleos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do microorganismo teste; este valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) [144]. Para essa avaliação, os métodos mais comumente utilizados são a difusão de ágar (disco de papel e poço) e o método da diluição [145]. Os ensaios Antimicrobianos, de difusão em ágar, foram realizados utilizando os espécimes destacados na tabela 4 abaixo. O experimento foi realizado junto a Rede BIONORTE/ AC.

Tabela 4: Descrição das estirpes de microorganismos utilizados para testes e respectivas concentrações das amostras testadas.

Estirpes	Amostra Teste/ Triplicata	Concentração
<i>Escherichia coli</i>	OCO N1 N3 N6 N9 N11 N12	20 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		20 µg/mL
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		20 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>		20 µg/mL
<i>Candida albicans</i>		20 µg/mL
<i>Candida parapsilosis</i>		20 µg/mL
<i>Candida tropicalis</i>		20 µg/mL
<i>Tricophyton rubum</i>		20 µg/mL

Ensaio com *Bactérias*

Foram utilizadas como microrganismos testes cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. As cepas de bactérias foram mantidas em Ágar Nutriente à temperatura de 35-37 °C [146; 147].

Para a preparação do meio, foram pesados 15 g de ágar-ágar e 21 g de Mueller Hinton, disponível comercialmente, sendo reidratado e preparado conforme as especificações do fabricante. Utilizou-se o micro-ondas por aproximadamente 15 minutos até obter uma solução homogênea e com o aspecto óptico translúcido. A solução foi transferida para um *Erlenmeyer*

e vedado com plástico filme. Posteriormente, os recipientes foram recobertos com folha de alumínio, devidamente identificados e levados à autoclave para esterilização (Figura 16). Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo uma camada inferior com aproximadamente 20mL de ágar bacteriológico [148].



Figura 16: Procedimento de preparação dos meios de culturas para avaliação das amostras de Ag-NPs e NEs. Fonte do Autor.

Após a etapa de plaqueamento, os meios foram armazenados para que se utilizassem culturas bacterianas *overnight*. As suspensões foram padronizadas de acordo com a turbidez da escala McFarland (Figura 17 a) correspondendo a aproximadamente 108 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) [148] e inoculadas com o auxílio de alças de Drigalski. Foram realizados poços esféricos equidistantes no ágar das placas com o auxílio de uma ponteira para acondicionar as soluções testes (Figura 17 b). As placas foram incubadas em estufa a 35,5°C por 24h. A atividade antimicrobiana de cada solução foi representada na forma de halos de inibição, que foram medidos com auxílio de uma régua (Figura 17 c) [149]. A zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço (Figura 17 d), até a margem onde há crescimento de microrganismos [149].

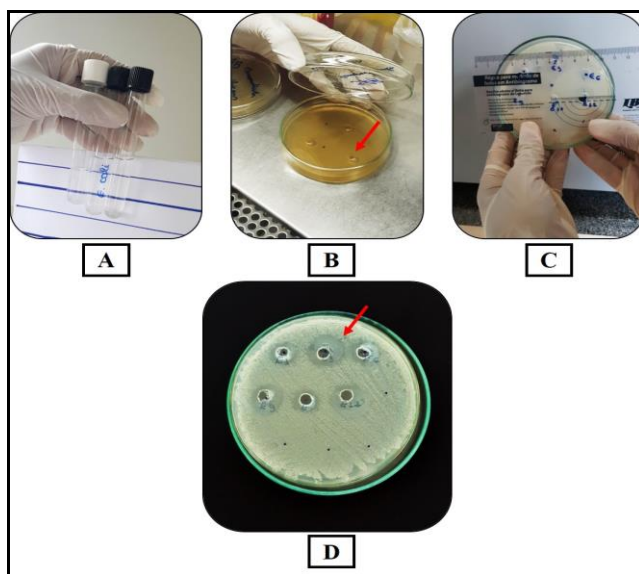


Figura 17: Procedimento de semeadura em meio de cultura onde, ajuste turbidez da escala McFarland (a); perfuração de poços para inoculação das amostras (b); representação do processo de extração de medidas dos halos (c) e formação de halos como resposta a solução antimicrobiana utilizada (d). Fonte do autor.

Ensaio com *Candida Albicans*

Foram utilizadas três espécies de cepas padrão de *Cândida sp.* armazenadas em cultura específica e congeladas à temperatura inferior a 30°C. As mesmas foram previamente descongeladas e inoculadas aerobiamente em meio de cultura específico e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 25h.

Para a preparação do meio, foram pesados 15 g de ágar e 30 ágar Sabouraud Dextrose, homogeneizados em 1 L de água destilada. Utilizou-se o micro-ondas por aproximadamente 15 minutos para obtenção de uma solução homogênea e com o aspecto óptico translúcido. A solução foi transferida para um Erlenmeyer e vedado com plástico filme. Posteriormente, os recipientes foram recobertos com folha de alumínio, devidamente identificados e levados à autoclave para esterilização. Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo uma camada inferior com aproximadamente 20mL da solução. As placas de Petri foram individualmente fechadas e mantidas em temperatura ambiente até a completa solidificação do meio de cultura [149].

Decorrido esse período, uma alçada da cultura de *Candida* foi retirada e inoculada em meio de ágar Sabouraud Dextrose contido em placas de Petri, previamente preparadas. As suspensões foram padronizadas de acordo com a turbidez da escala McFarland [150; 151].

Dessa maneira as leveduras cresceram aerobicamente em cultura *overnight* a 37° C por 24 horas, conforme recomendado no Manual de Microbiologia Clínica [152]. Foram realizadas perfurações dos poços nos meios contidos nas placas para acondicionamento de 20 µL das amostras a serem analisadas. As zonas dos halos foram medidas com o auxílio de uma régua.

Ensaaios com *T. rubrum*

O fungo filamentoso, *T. rubrum* cedido pelo Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), foi identificado pautado com as chaves taxonômicas propostas por [153]. O repique consistiu em retirar o micélio fúngico diretamente da placa com a colônia matriz com o auxílio de uma alça de platina flambada, e transferi-lo para placas de Petri contendo meio de Ágar-Sabourad. O procedimento de análise antimicrobiana do fungo foi realizado seguindo protocolo descrito para ensaios com *Candida*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos sobre a formação e caracterização das nanopartículas de prata obtidas através do Método da Combustão Líquida assistida via micro-ondas, o processo de formulação das NEs, bem como os resultados de caracterização.

6.1 Formação e caracterização das de Ag-NPs

Após a síntese do material com diferentes proporções de catalisador foram investigadas, através de técnicas de caracterização, a que melhor apresentou condições físicas e morfológicas para serem incluídas na composição das NEs. Como foram sintetizadas três tipos de amostras de acordo com a quantidade de catalisador (ureia), amostra +25%, amostra -25% e equação balanceada (EB), o processo de caracterização inicial por DRX, FTIR, MET e MEV foram fundamentais para escolha da amostra mais apropriada para a preparação das formulações de NES para uso tópico. Com as análises realizadas por Difratorômetro de Raios X (DRX) aplicando a equação de Scherrer [154] que relaciona o tamanho aparente do cristalino, foi possível identificar que a amostra +25%, apresentou menor dimensão quanto as amostras comparadas (EB e -25%), adequado para o tipo de formulação a ser elaborada neste estudo.

6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi possível de forma qualitativa a morfologia das Ag-NPs sintetizadas com diferentes porcentagens de catalisador. As fotomicrografias são representadas na Figura 18, para imagem antes do processo de calcinação e posterior ao processo. Observa-se que a morfologia não foi alterada devido ao processo de calcinação. As amostras apresentam aglomeradas com superfícies homogêneas adquirindo aspecto opaco [155]. Também se observou formas esféricas ou semiesféricas.

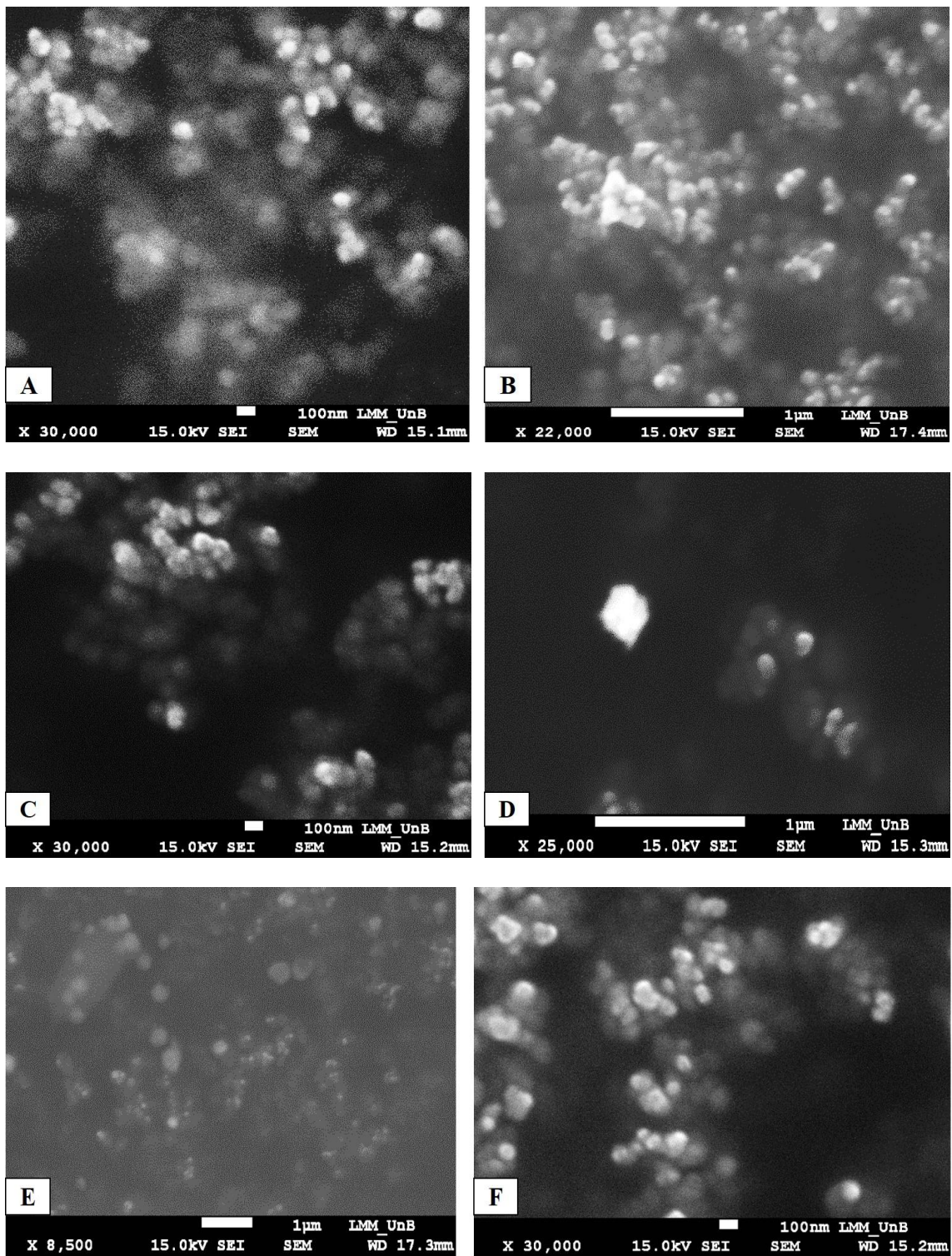


Figura 18: Fotomicrografia nas Ag-NPs das amostras para efeito comparativo quanto a dimensão. (A) EB antes da calcinação em 30.000x (B) e pós calcinação em 22.000x; (C) -25% sem calcinação 30.000x e (D) pós calcinação 25.000x; (E) +25% sem calcinação 8.500x e (F) pós calcinação 30.000x.

6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A identificação das NPs de Ag-NPs foi realizada através do uso da técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva, utilizada para caracterizar amostras pela detecção dos elementos químicos constituintes de forma semi-qualitativa realizadas conforme demonstradas nas imagens da figura 19.

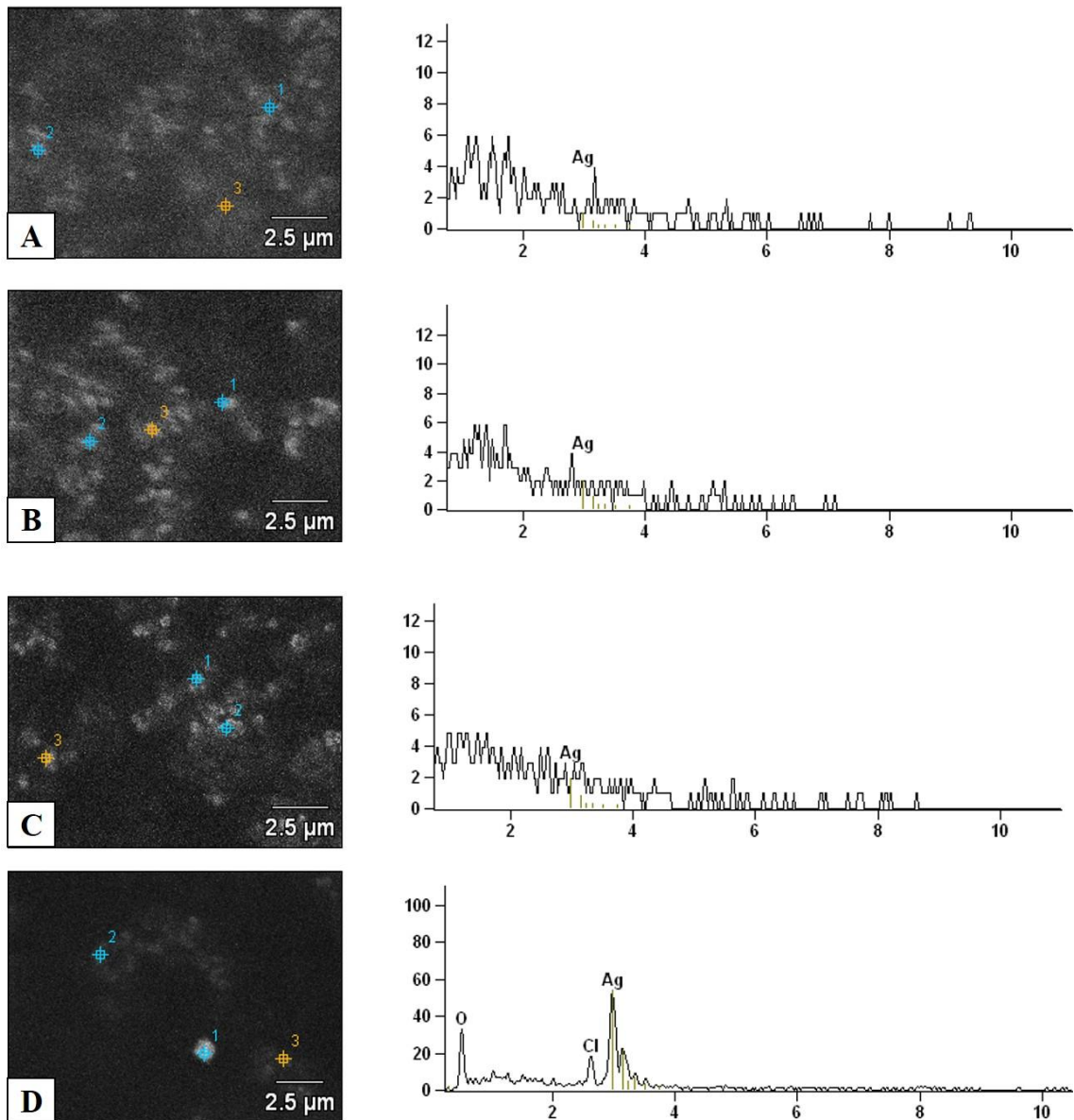


Figura 19: Imagens de elétrons retro-espalhados de amostra com +25% catalisador antes da calcinação (A), +25% catalisador pós calcinação (B), -25% catalisador antes da calcinação (C) e +25% catalisador pós procedimento de calcinação.

Em todas as amostras analisadas, indicaram a presença de Ag-NPs distribuídas sobre a superfície da nanoestrutura. Esses resultados sinalizam que a técnica de Combustão Líquida Assistida é eficaz quanto a impregnação do elemento de escolha nanoestrutural.

6.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A caracterização do tamanho e morfologia das Ag-NPs foram efetuadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, onde as nanoestruturas foram dispersas sobre o grid de cobre demonstrado na Figura 20. O processo de análise em MET foi realizado no Laboratório de Microscopia do IB/UnB, utilizando aparelho da marca JOEL, modelo Jem – 1011 (*Electron Microscope*). Foram analisados o diâmetro e formato para confirmação o formato esférico e diâmetro médio que variaram entre $(30\pm 0,8)$ nm a $(80\pm 0,8)$ nm.

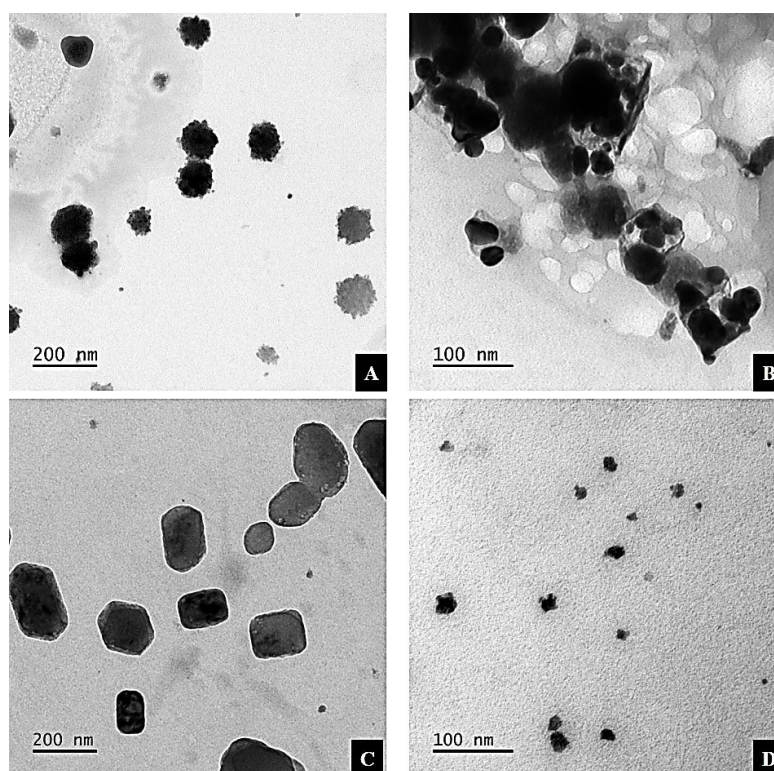


Figura 20: Fotomicrografias de Ag-NPs sintetizadas por via de Combustão Líquida Assistida, dispersas sobre o grid de cobre e obtidas por MET onde: de amostra com +25% catalisador antes da calcinação (A), +25% catalisador pós calcinação (B), -25% de catalisador antes da calcinação (C) e -25% catalisador pós procedimento de calcinação.

6.1.4 Termogravimetria (TG)/DTG

A Termogravimetria é uma técnica de análise térmica que permite avaliar a perda ou ganho de massa em função da temperatura [156]. Foram avaliadas a estabilidade térmica da amostra de Ag-NPs (+25%) representada no termograma abaixo (Figura 21).

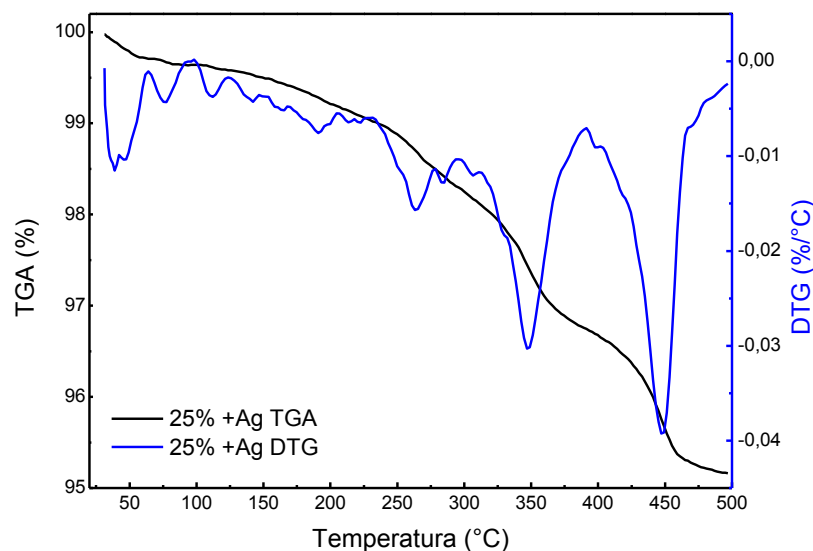


Figura 21: Termograma TG (Linha preta) e DTG (Linha azul) das Ag-NPs obtidas pelo método da Combustão Líquida assistida via micro-ondas com 25% + de catalisador a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e faixa de temperatura de 25- 500°C.

Nas curvas de TG da amostra de Ag-NPs, a degradação térmica ocorreu em quatorze estágios na faixa da temperatura analisada (25-500°C). A perda de massa ocorreu em temperatura de pico igual a 30°C com perda de massa igual a 1,5%, provavelmente devido a desidratação da amostra em função do aquecimento. As etapas de cristalização ocorreram na faixa da temperatura de 330 e 450°C, onde a etapa de decomposição da amostra, provavelmente, ocorreu simultaneamente a cristalização em temperatura de 450°C

6.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizados espectros de FTIR com o objetivo de identificar quais os tipos de grupos funcionais que contribuem para a formação das Ag-NPs (Figura 26). A espectroscopia

na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas [157]. Os picos distintos do espectro identificam o tipo de material, já a quantidade é determinada pela altura do pico.

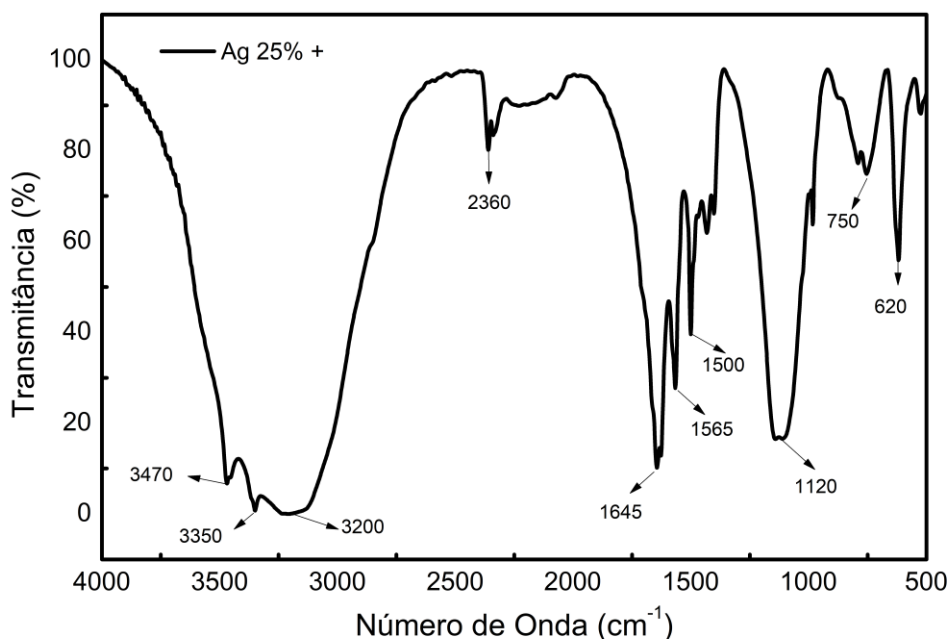


Figura 22: Espectro das NPs-Ag sintetizadas pelo método da Combustão Líquida Assistida via micro-ondas com +25% de catalisador.

A solução apresentou uma banda de absorção em 3200 cm^{-1} atribuída ao grupo OH e 3470 cm^{-1} correspondente ao grupo NH. A banda 1645 cm^{-1} pode ser referente ao modo de vibração do grupo C=C, enquanto 1120 cm^{-1} , ao grupo C-N. As Ag-NPs apresenta bandas bem definidas entre 1500 cm^{-1} e 750 cm^{-1} sugere a interação das partículas de prata com o grupo OH [158; 159].

6.1.6. DRX

Os difratogramas foram coletados no modo contínuo com passo de $0,02^\circ$ e intervalo angular de 20° a 80° em 2θ no LAMUTA da Faculdade de Geociências da UFMT (Figura 27). A identificação de fases das amostras foi realizada pelo método de comparação do padrão de difração experimental e padrões cristalográficos conhecidos na literatura por meio do banco de dados PDF2-2003 (Powder Diffraction File) da ICDD (International Centre for Diffraction Data). As AgNPs podem ser identificadas através do seu padrão de difração característico,

sendo o pico mais alto correspondendo ao elemento em maior quantidade e os demais a outros presentes na amostra analisada. A figura 30 apresentou pico de difração para Ag-NPs em aproximadamente 38° e 44°, provavelmente relacionado a um plano cristalino [160] de simetria cúbica caracterizando as fases cristalinas de maior relevância.

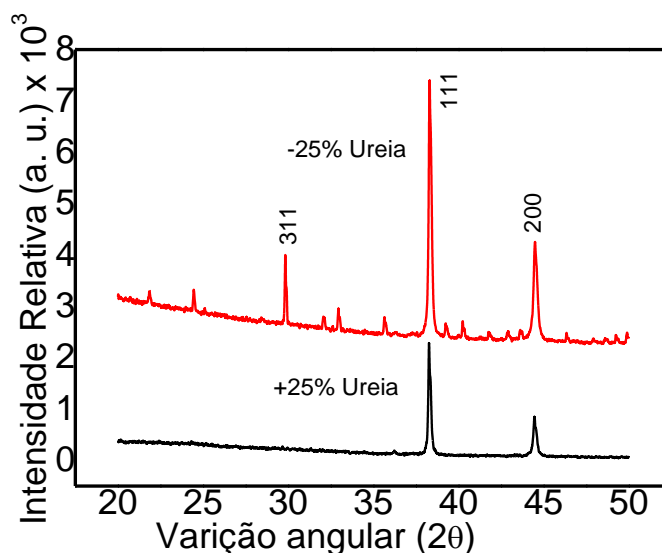


Figura 23: Difratograma de raios-X das Ag-NPs sintetizadas pelo método da Combustão Líquida Assistida via micro-ondas com -25% e +25% catalisador ureia.

6.2. Formulações das NEs e Testes de Estabilidade

As amostras de NEs associadas ou não a nanopartícula, Itraconazol e Terbinafina formuladas à base de óleo de Copaíba foram produzidas utilizando a técnica de inversão de fases e homogeneização de alta pressão, em um tempo de 30 minutos de suspensão. As emulsões ou nanoemulsões, de uma forma geral, podem ser formadas pela combinação de tensoativos lipofílicos e hidrofílicos ou ainda com um único tensoativo [161]. As NEs foram formuladas utilizando um tensoativo, Tween 80, e um Co-tensoativo, Polietilenoglicol que possui ação umectante. Para a obtenção de uma NE estável, é necessário considerar o EHL e a solubilidade da cadeia lipídica do tensoativo na fase oleosa [162]. Esse valor pode ser determinado empiricamente, através da combinação de diferentes quantidades de óleo e com tensoativos de diferentes valores de EHL [162; 163] e assim determinar qual o valor EHL que produz a NE mais estável.

Portanto, foi necessário dividir em etapas o processo de obtenção de NE estável onde, em um primeiro momento, utilizou-se os componentes em diferentes combinações de tensoativos para formular as NEs (NE1 a NE9) para detectar qual valor da concentração de

surfactantes, determinaria a amostra mais estável. A segunda etapa foi obter a NE associada a Ag-NPs e medicamentos alopáticos convencionais.

Em emulsões preparadas com amostras de óleo de andiroba distintas, o EHL apresentou valor de 7,0 e 11,0 para cada uma das amostras e valor de EHL de 15,0 para óleo de copaíba. Quando associados os dois óleos (andiroba e copaíba) o valor do EHL foi igual a 13,0 [163]. Vários óleos vegetais apresentou o EHL entre 7,0 e 9,0 [164]. Entre as emulsões obtidas com óleo de maracujá, utilizando polissorbato 80 e monooleato sorbitano, a emulsão no valor de EHL 10,0 foi a única que se manteve inalterada após um período de 24 horas [163].

Como exposto anteriormente, os valores do EHL são importantes quando utilizados dois tipos de surfactantes na formulação, sendo um hidrofílico e outro lipofílico. Nesse estudo, foi utilizado um surfactante lipofílico o Tween 80 (Polisorbato 80) como agente emulsificante em concentrações variadas, associado ao polietilenoglicol.

Conforme observado na tabela 5, a formulação teste que apresentou maior estabilidade foi a NE 2, na qual não apresentou separação de fases após sua produção e após um período de 24h.

Foram observados parâmetros na análise macroscópica quanto a estabilidade física do sistema emulsionado, bem como a translucência e separação de fases das NEs [162;163]. Na análise microscópica, observou-se a homogeneidade da amostra bem como o movimento Browniano após a síntese das NEs e 24h após este procedimento.

Tabela 5: Análise Macroscópica e Microscópica das formulações-teste.

Formulação	Análise Macroscópica				Análise Microscópica			
	Cremação/Separação de fases		Translucente/Leitosa		Homogeneidade		Movimento Browniano	
	PS	24h	PS	24h	PS	24h	PS	24h
N1	-	SF	L	T	+++	++	+	+
N2	-	-	L	L	+++	++	+	+
N3	-	SF	L	L	+++	+	+	-
N4	-	-	L	L	+++	+	+	-
N5	-	SF	L	L	+++	+	-	-
N6	-	SF	L	L	+++	+	-	-
N7	SF	SF	L	L	+	+	-	-
N8	-	SF	L	L	++	+	-	-
N9	-	SF	L	L	++	+	-	-

Legenda: PS – Pós síntese, **24h** – Pós 24 horas, **L** – leitosa, **T** – Translucente, **SF** – Separação de fases, + - Intensidade baixa, ++ - Intensidade média, +++ - Intensidade Alta, - Ausência de característica.

Conforme apresentado na figura 24, as imagens das amostras, obtidas por microscopia de luz, que apresentam cremação são N4, N5, N6, N7, N8 e N9. Apesar de apresentar sinais de cremação, as amostras não apresentaram instabilidade em outros testes físico-químicos, como a separação de fases na etapa de centrifugação. Em estudos realizados por [165] onde suas formulações mostraram floculação e coalescência a partir da análise microscópica, porem apresentaram-se estáveis nos demais ensaios.

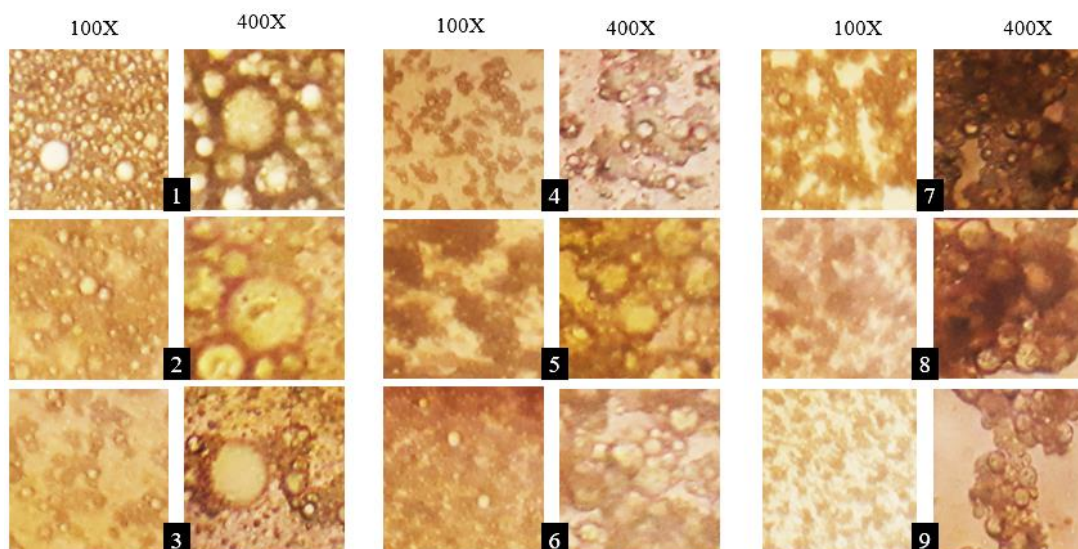


Imagem 24: Microscopia de luz das nanoformulações-teste realizadas em aumento de 100X e 400X, onde: 1 – NE padrão, 2 a 9 – Nes formuladas com diferentes concentrações de tensoativo e OCO.

Após a síntese das NEs-Teste e a identificação da concentração dos componentes das fases aquosa e oleosa, a N2 apresentou melhor estabilidade e, portanto, as quantidades utilizadas para sua síntese foram utilizadas para formular as demais NEs associadas (Figura 25).

Foram realizadas as avaliações macroscópicas e microscópicas das NEs associadas após um período de 24h analisando os mesmos aspectos considerados para as NEs-Teste. As NEs (N5, N6, N7 e N11) formuladas com Itraconazol apresentaram separação de fases (Tabela 6).

Tabela 6: Análise Macroscópica e Microscópica das formulações associadas.

Formulação	Análise Macroscópica				Análise Microscópica			
	Cremação/Separação de fases		Translucente/Leitosa		Homogeneidade		Movimento Browniano	
	PS	24h	PS	24h	PS	24h	PS	24h
N1	-	-	L	T	+++	++	+	+
N2	-	-	L	L	+++	++	+	+
N3	-	-	L	L	+++	++	+	+
N4	-	-	L	L	+++	++	+	-
N5	-	SF	L	L	+++	+	-	-
N6	-	SF	L	L	+++	+	-	-
N7	-	SF	L	L	+	+	-	-
N8	-	-	L	L	++	++	-	-
N9	-	-	L	L	++	++	-	-
N10	-	-	L	L	++	++	-	-
N11	-	SF	L	L	++	+	-	-
N12	-	-	L	L	++	++	-	-

Legenda: PS – Pós síntese, 24h – Pós 24 horas, L – leitosa, T – Translucente, SF – Separação de fases, + - Intensidade baixa, ++ - Intensidade média, +++ - Intensidade Alta, - Ausência de característica.



Figura 25: Nanoformulações associadas após 24 horas de síntese, observação quanto ao aspecto de separação de fases.

As formulações foram analisadas em microscopia de luz com a finalidade de avaliar a microestrutura do sistema disperso [166]. As estruturas microscópicas foram observadas em objetivas de 10X e 40X (Figura 26) para melhor visualização da presença e distribuição de glóbulos e dessa forma constatar a estabilidade das formulações, que dependem da proporção apropriada de tensoativos e um processo correto de emulsificação [167].

A partir desta análise, foi possível observar que as amostras apresentam glóbulos pequenos e distribuídos de forma uniforme representados nas amostras 1, 2, 3 e 4. O tensoativo influencia na estabilidade das formulações originando nanoemulsões com duas populações de tamanho de glóbulos diferentes, favorecendo a instabilidade do sistema [168].

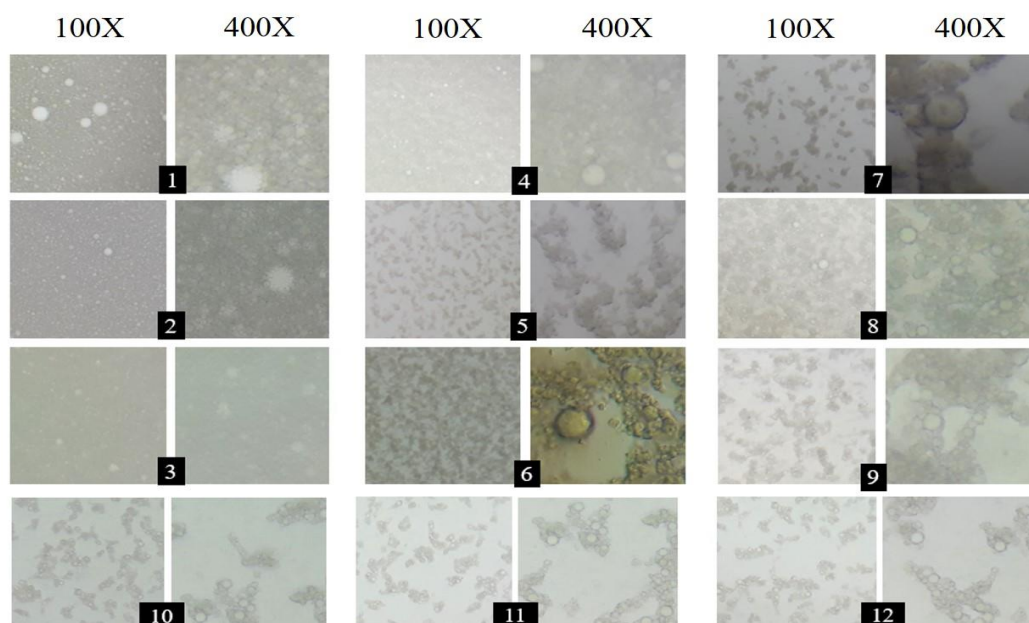


Figura 26: microscopia de luz das nanoformulações associadas, realizadas em aumento de 100X e 400X, onde: 1 – NE padrão, 2 a 4 – NEs formuladas com diferentes concentrações de Ag-NPs, 5 a 7 – NEs formuladas com Itraconazol e diferentes concentrações de Ag-NPs, 8 a 10 – NEs formuladas com Terbinafina e diferentes concentrações de Ag-NPs, 11 – NEs formuladas com Itraconazol e 12 – NEs formuladas com Terbinafina.

Para amostras a partir de N5, os glóbulos encontram-se floclados com distribuição heterogênea de tamanho. Em todas as amostras estudadas, as nanoemulsões possuem formas esféricas e não são observados aglomerados formando estruturas como “cacho de uva” das amostras N1 a N7 [169]. A partir da amostra N8, é observado a presença de glóbulos maiores, o que não se deve a quantidade de óleo que é a mesma para todas as amostras e sim pelo medicamento alopático adicionado a composição das amostras de N8 a N12, Itraconazol e Terbinafina.

As alterações no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, bem como a formação de precipitados, podem ser ocasionadas por fatores ambientais como a temperatura, luz e oxigênio, resultando em reações químicas e físicas nos componentes do sistema [170].

6.2.1 Determinação dos valores de PH

O pH das formulações está estritamente ligado aos excipientes utilizados [171]. Neste estudo, o pH das NEs variou de 5,21 a 6,67 (Tabela 7). Nanoemulsões são física e quimicamente mais estáveis em pH de 6,5 a 8,0 [170]. As formulações apresentaram PH levemente ácido, compatível com o pH da pele que apresenta valores entre 4,1 a 5,8 [172].

Tabela 7: Avaliação do pH das nano formulações a base de OCO.

Formulação	Valor do PH
N1	5,21
N2	5,34
N3	6,28
N4	6,32
N5	6,55
N6	6,52
N7	6,56
N8	6,12
N9	6,11
N10	6,18
N11	6,67
N12	6,32

Os valores de pHs obtidos inicialmente mostram que as formulações são compatíveis com a pele, entretanto, as amostras N8, N9 e N10 após o período de 60 dias, a temperatura ambiente, apresentaram uma queda ficando abaixo de 5,0 (Figura 27).

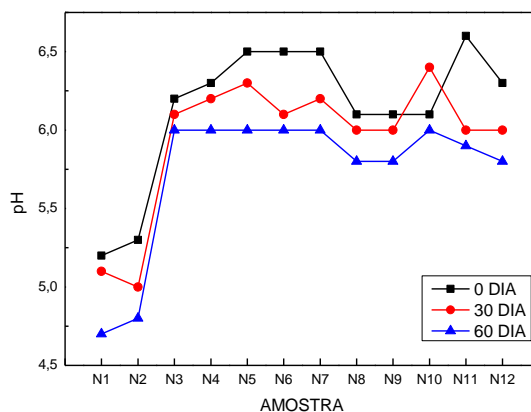


Figura 27: Valores do pH obtidos para nanoemulsão armazenada sob temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Sistemas emulsionados armazenados em temperaturas baixas, $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, tendem a sofrer ligeira diminuição do pH [170], isso se deve as reações degradativas de ácidos graxos sendo favorecida por valores elevados e ocorrendo o contrário em valores mais baixos de temperatura [171].

6.2.2 Condutividade

A condutividade elétrica é um parâmetro que ajuda a determinar o tipo de NE (O/A ou A/O) e caracterizá-la fisicamente [172], indicando um parâmetro de instabilidade que pode influenciar na granulometria das emulsões uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição com a agregação dos glóbulos [173; 174] (Tabela 8).

Quando se trata de uma NE O/A, a fase hidrofílica apresenta valores maiores de condutividade comparada com a fase lipofílica, dessa forma, o aumento da condutividade está relacionado a maior mobilidade de íons presentes na fase contínua causada pelo aquecimento [174]. O decréscimo repentino da condutividade, no qual o conteúdo oleoso torna-se a fase contínua, ocorre a diminuição da condução elétrica do sistema [175]. Em uma Microemulsão, por exemplo, o tipo O/A tem efeito condutor, enquanto o tipo A/O tem efeito isolante [176; 177]. Quando ocorre a diminuição da concentração de óleo de castanha-do-Brasil, por exemplo, o valor de condutividade diminuí e quanto ocorre o aumento da concentração do tensoativo Span 60, utilizado na formulação, o valor da condutividade elétrica aumenta, pois o tensoativo influencia diretamente na superfície da gotícula [178].

Tabela 8: Comparação do valor do PH e condutividade das formulações obtidas.

Formulação	Valor do PH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)
N1	5,21	33,09
N2	5,34	30,07
N3	6,28	31,92
N4	6,32	31,45
N5	6,55	28,08
N6	6,52	28,42
N7	6,56	29,39
N8	6,12	34,47
N9	6,11	33,52
N10	6,18	33,61
N11	6,67	30,06
N12	6,32	32,48

Em NEs formuladas com extrato de *Opuntia ficus-indica*, os valores de condutividade variaram de 676,00 a 953,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, considerados valores altos para esse parâmetro, sendo indicativo de NEs que possuem a fase aquosa como sua fase externa (O/A) [179]. Em microemulsões formuladas com óleo de babaçu, a condutividade apresentou valor 20,96 $\mu\text{S}/\text{cm}$ considerado baixo, não característico de emulsão O/A [177]. No entanto, em microemulsões formuladas com crisina, os valores da condutividade apresentaram valores entre 26,57 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 24,66 $\mu\text{S}/\text{cm}$ considerados sugestivos de microestruturas O/A [180].

6.2.3 Centrifugação e Estresse Térmico

O teste de centrifugação aumenta a força gravitacional atuante sobre os glóbulos e ocasiona o aumento de colisões entre esses, o que pode acarretar em cremação ou sedimentação permitindo a previsão da estabilidade do sistema disperso [170] (Tabela 9). A desestabilização das amostras produzidas apresentou-se modificadas após o 3º ciclo sendo considerado normal [181].

Tabela 9: Comportamento das formulações frente ao teste de centrifugação.

Formulação	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
N1	NR	NR	NR
N2	NR	NR	NR
N3	NR	NR	NR
N4	NR	NR	NR
N5	NR	NR	LM
N6	NR	NR	LM
N7	NR	NR	LM
N8	NR	NR	NR
N9	NR	NR	NR
N10	NR	NR	NR
N11	NR	NR	LM
N12	NR	NR	NR

Legenda: NR= normal; **LM**= levemente modificado; **M**= modificado.

Ao verificar qualitativamente o efeito termodinâmico das NEs, as mesmas apresentaram boa estabilidade física em temperatura máxima de 50°C (Tabela 10).

Tabela 10: Comportamento das formulações frente ao teste de estresse térmico.

Formulação	Temperatura °C								
	40	45	50	55	60	65	70	75	80
N1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM
N2	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N3	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N4	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N5	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM	LM
N6	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM	LM
N7	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM	LM
N8	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N9	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N10	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM
N11	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM	LM
N12	NR	NR	NR	NR	LM	LM	LM	LM	LM

Legenda: NR= normal; LM= levemente modificado; M= modificado.

As amostras não apresentaram alterações de valores de PH após procedimento de medidas do estresse térmico (Tabela 11), o que demonstra que os componentes não sofreram alterações nas etapas de aquecimento.

Tabela 11: Valores do pH antes e após teste de estresse térmico.

Formulação	Valor do PH	Valor do PH após estresse térmico
N1	5,21	5,17
N2	5,34	5,32
N3	6,28	6,23
N4	6,32	6,29
N5	6,55	6,47
N6	6,52	6,49
N7	6,56	6,51
N8	6,12	5,09
N9	6,11	5,05
N10	6,18	6,13
N11	6,67	6,58
N12	6,32	6,27

6.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas no MEV das NEs mostraram o perfil de superfícies rugosas e formas indefinidas das nanoestruturas (Figura 28 e 29). A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X possibilitou a detecção de pico do elemento prata (Ag) apenas na amostra de N12. De todas as amostras formuladas, as leituras em MEV foram realizadas nas nanoemulsões N1, N3, N6, N9, N11 e N12. Em todas as medições realizadas em EDS, pode-

se observar picos de elementos distintos presentes na amostra, sendo eles: oxigênio (O), Alumínio (Al), Ouro (Au), Potássio (K), Silício (Si), Ferro (Fe) e Cloro (Cl). Todas as análises foram feitas no aumento de 10.000x a 20.000x, e voltagem de 15 keV.

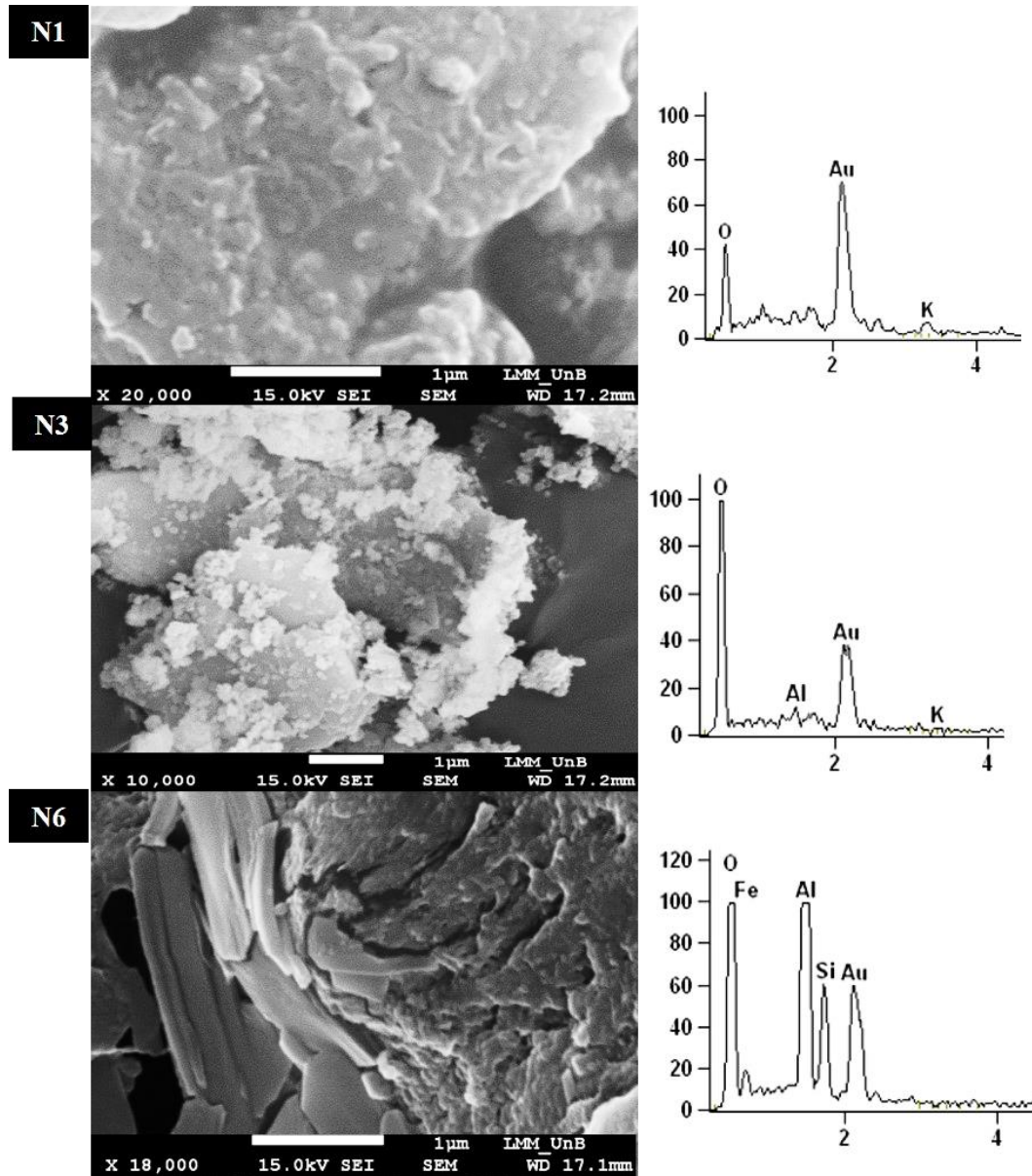


Figura 28: Caracterização morfológica das nanoemulsões por MEV e seus respectivos gráficos de Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-x. Nanoestruturas com formatos irregulares apresentando superfícies rugosas. N1- NE padrão 20.000x, N3 – NE formulada com NPs-Ag 10.000X, N6 – NE formulada com Ag-NPs e Itraconazol 18.000x.

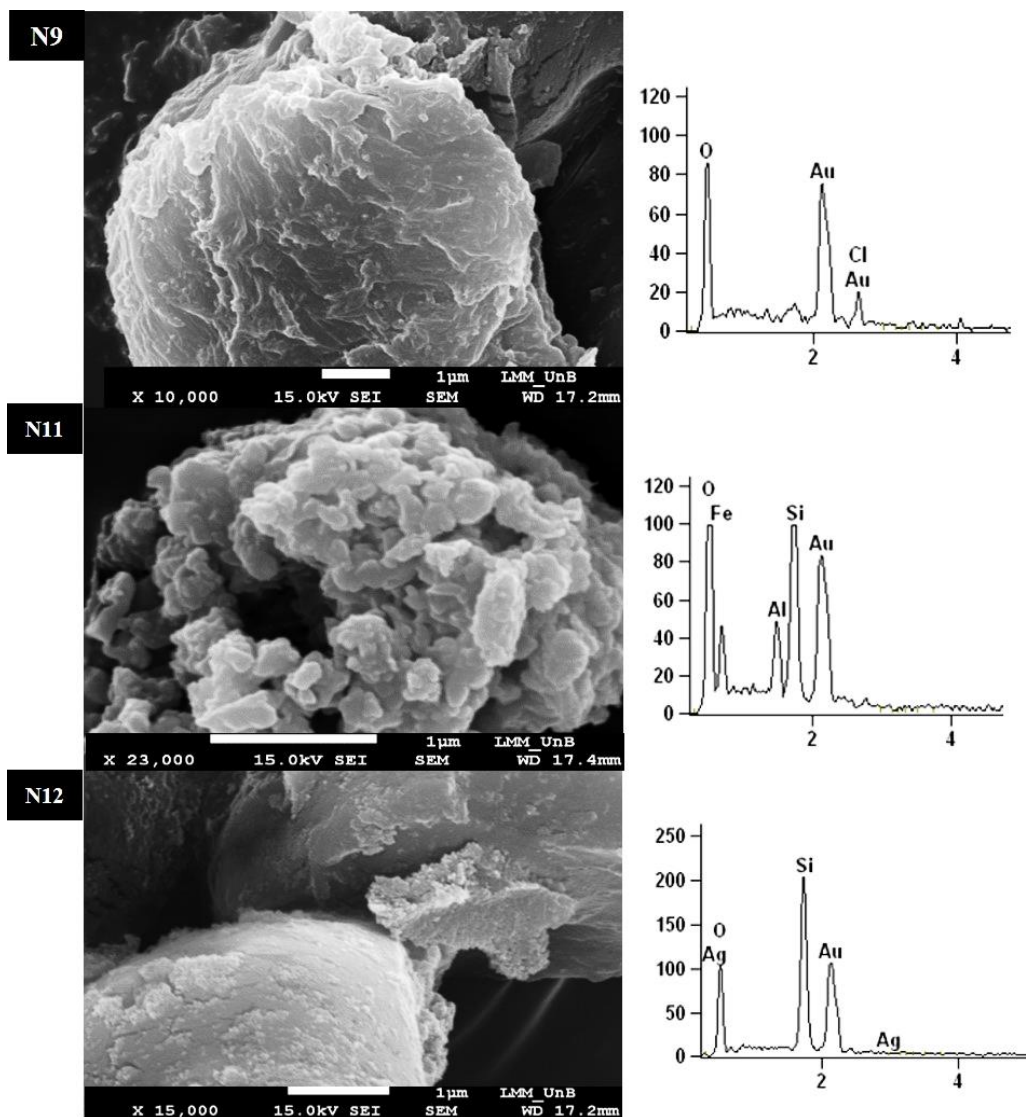


Figura 29: Caracterização morfológica das nanoemulsões por MEV e seus respectivos gráficos de Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-X. Nanoestruturas com formatos irregulares apresentando superfícies rugosas onde, N9 – NE formulada com Ag-NPs e Terbinafina 10.000X, N11 – NE formulada com Itraconazol 23.000X e N12 – NE formulada com Terbinafina 15.000X onde a amostra apresentou constituída do elemento Ag.

6.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As fotomicrografias obtidas por MET são mostradas nas figuras 30, 31 e 32. As amostras de NEs, N1 e NE3, sem o fármaco alopático em sua composição exibem formatos predominantemente esféricos e de tamanho nanométrico. As imagens revelam regiões com densidades diferentes, ou seja, um núcleo escuro e um revestimento, provavelmente constituído por moléculas de tensoativos que se encontram adsorvidas à superfície das gotículas [182].

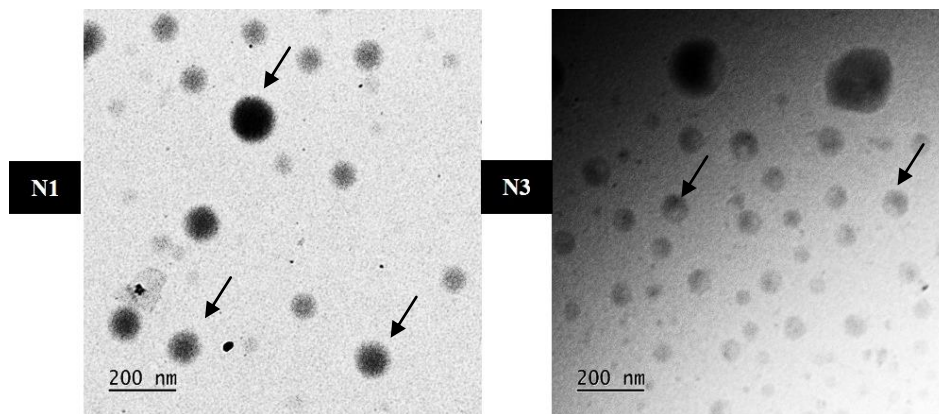


Figura 30: Fotomicrografias da NEs padrão formulada a base de OCO (N1), onde setas indicam a presença de um núcleo esférico e NE padrão associada a 0,01g de NPs-Ag (N3), 40.000X, onde as setas indicam o núcleo de revestimento.

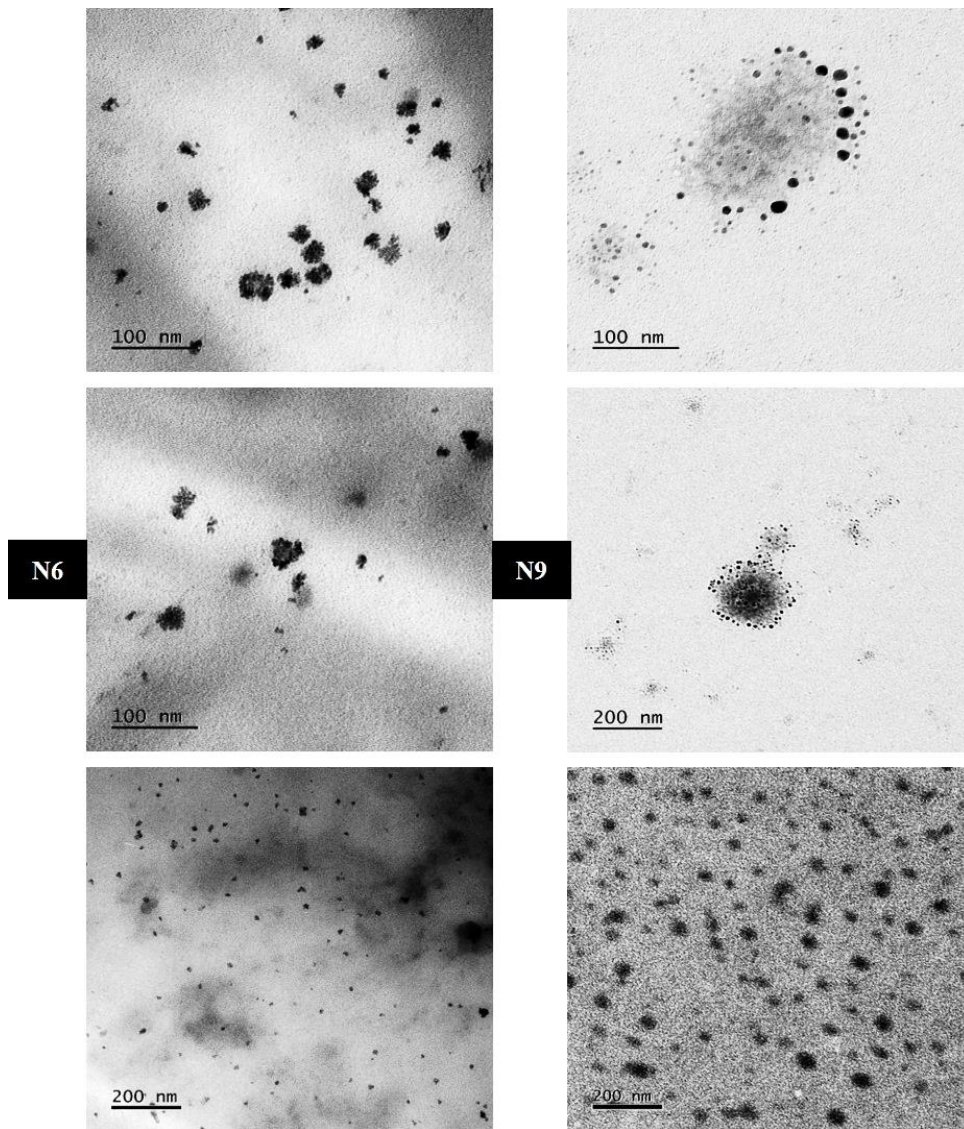


Figura 31: Fotomicrografias da NE associada com Ag-NPs e Itraconazol (N6) e NE associada com Ag-NPs e Terbinafina (N9), 40.000X.

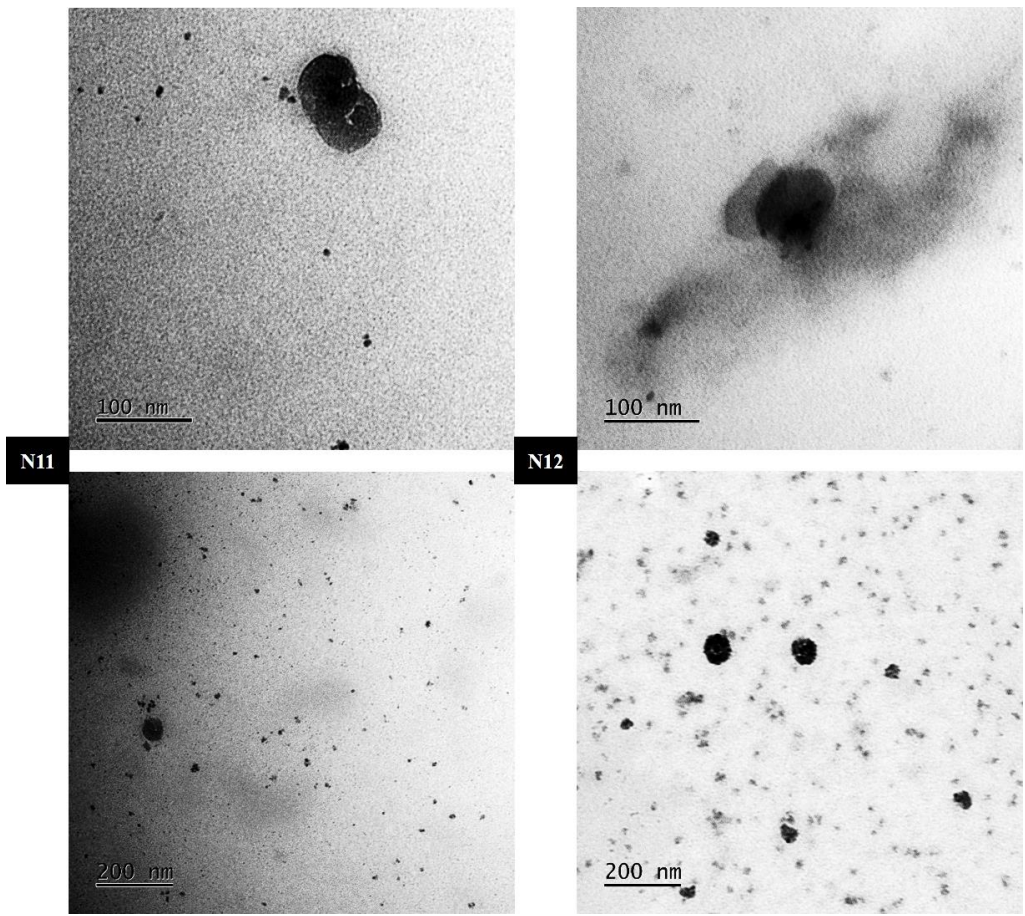


Figura 32: Fotomicrografias da NE associada (N11), formulada com Itraconazol. Fotomicrografias da NE associada (N12), formulada com Terbinafina, 40.000X.

6.2.6 Potencial ZetaSizer

Foram analisadas o diâmetro médio (Z/nm), o índice de Polidispersão (PdI e o Potencial Zeta (PZ) da NE matriz (N1) e associações. O estudo da curva do PZ da nanoemulsão de OCO permitiu a medir a estabilidade da suspensão além de fornecer informações sobre o diâmetro das partículas a estabilidade da suspensão em água [183]. Os resultados variaram de acordo com a composição da mesma de acordo com o tamanho, PdI e PZ (Tabela 12). As formulações entre N1 a N4 expressa valores inferiores de PZ, quando comparadas as demais amostras, que condiz com o grau monodisperso (Figura 37). Neste estudo utilizou-se um tensoativo não iônico (Tween 80), o que leva a se esperar uma carga elétrica próxima a zero [184]. À medida que as associações apresentam mais componentes, os valores de PdI e PZ também aumentaram. Quando o valor é suficientemente elevado, as gotículas são impedidas de se agregarem devido à repulsão eletrostática entre elas [185; 186].

Tabela 12: Diâmetro, Índice de Polidispersão e PZ das formulações calculados por Difração dLaser.

Formulações	Z-Average (nm)	PdI	Potencial (mV)
N1	185,4	0,167	-20,4
N2	173	0,183	-12,8
N3	180,2	0,159	-14,8
N4	177,3	0,171	-13,8
N5	176,1	0,361	0,455
N6	185,1	0,409	0,654
N7	276,2	0,627	1,26
N8	217,5	0,244	11
N9	204,2	0,278	7,07
N10	211,8	0,419	8,46
N11	157,1	0,395	2,06
N12	243,3	0,513	11,1

Os valores ideais os PZs estão no intervalo de 20 mV e próximos de 25 mV [187]. Se o potencial for relativamente elevado em módulo (maior de 25mV) as forças repulsivas do sistema superam as forças de London que atraem as gotículas entre si, caracterizando um sistema defloculado, e valores superiores a 30mV são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática [189]. A amostra N1, N2, N3 e N4 (Figura 33) apresentaram valores dentro do intervalo, -20,4, -12,8, -14,8 e -13,8 respectivamente, sendo um indicativo de que as gotículas presentes na amostra, possuem forças de repulsão forte que impedem sua coalescência e mantém a estabilidade do sistema [190]. Essa negatividade pode ser atribuída à possível presença de grupos ácido carboxílico principalmente de tensoativos na superfície das

gotículas, as quais ionizam formando gotículas carregadas negativamente [189; 191], cuja ionização desses grupos dependem do pH do sistema, quanto maior esse parâmetro, mais negativo o PZ [192]. Em contrapartida, as mesmas amostras apresentaram valores baixos para PdI, indicando baixa polidispersividade.

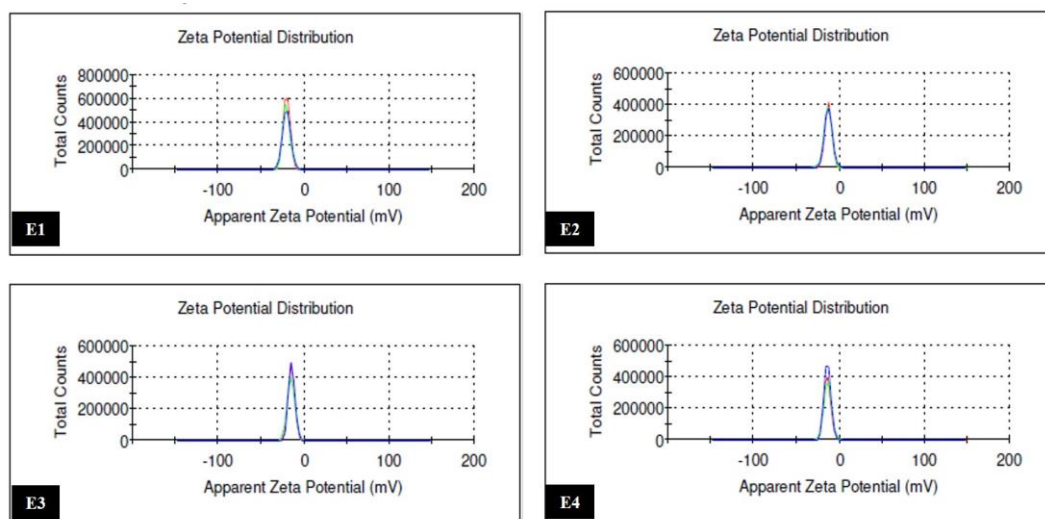


Figura 33: Distribuição do PZ nas formulações que apresentaram resultados de NEs estáveis (resistente a agregação).

O resultado do PZ não é o único fator que atue na estabilidade coloidal de uma nanoemulsão, ele contribui para isso, e de modo geral, um PZ com módulo elevado (acima de 30 mV) é geralmente associado a uma expressiva estabilidade coloidal [193]. Os valores de PZ que caracterizam um sistema nanoemulsionado estável representa valores no intervalo $>+30\text{mV}$ e $<-30\text{mV}$.

Os resultados obtidos evidenciam que as formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio inferior a 200 nm, semelhantes a [194]. Diante desse resultado, essas formulações são consideradas viáveis para aplicação por via tópica. Os valores do raio médio das gotículas caracterizam um sistema de nanoemulsão (Figura 34). Quando o diâmetro é inferior a 300 nm. As nanoemulsões devem, por sua vez, apresentar raio médio inferior a 100 nm, ou seja, um diâmetro médio inferior a 200 nm [65; 77].

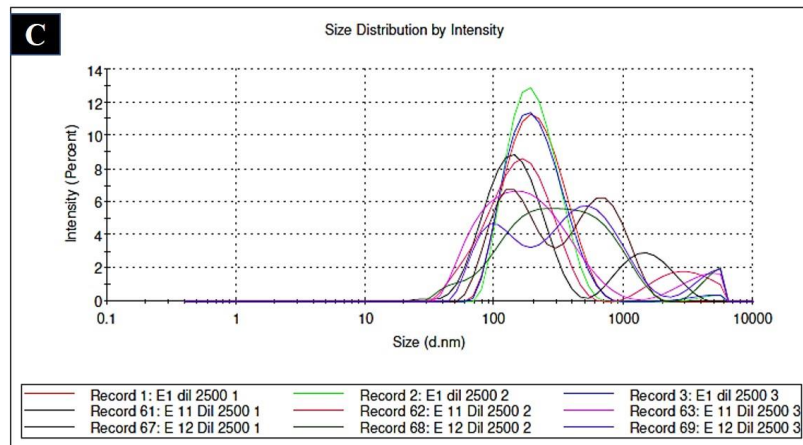
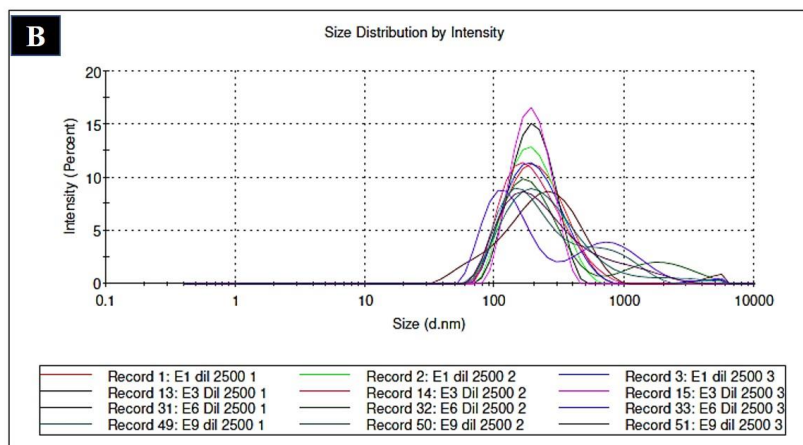
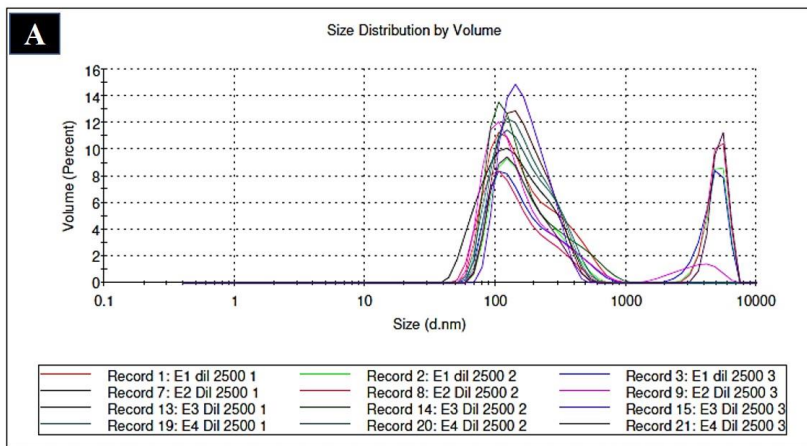


Figura 34: Diâmetro das formulações associadas (A) - E1/E2/E3/E4; (B) - E1/E3/E6/E9; (C) - E1/E11/E12.

6.3. Avaliação da susceptibilidade em fungos e bactérias

As atividades antibacteriana e antifúngicas foram determinadas pelo tamanho da região de inibição mostrado na figura 35.

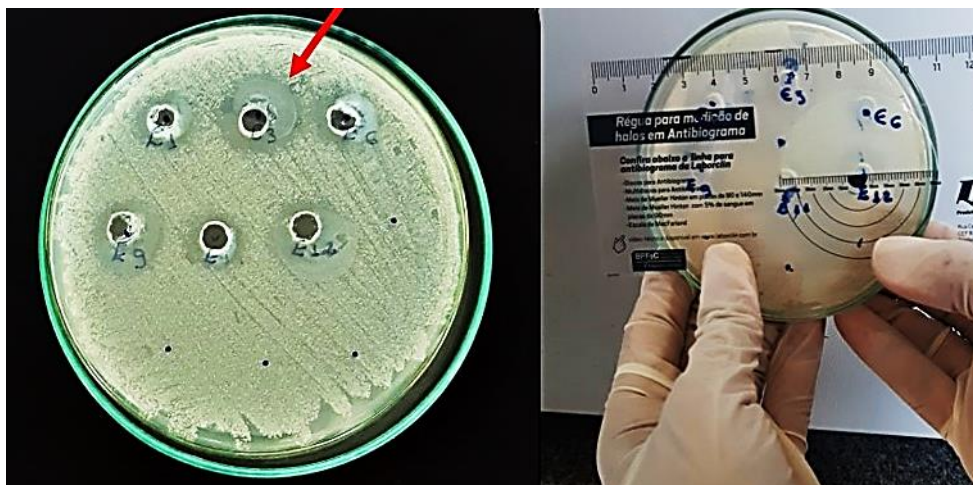


Figura 35: (Fonte do Autor) Efeito inibidor das diferentes amostras testadas.

As amostras foram testadas mostraram resultados significativos para alguns dos microorganismos testados, porém não apresentou efeito para outros como demonstrados em testes realizados em cultura do fungo *trichophyton rubrum*, onde as amostras N8, N9, N10 e N12 formuladas com o fármaco Terbinafina, inibiu 100% o crescimento.

As amostras N2, N3, N6, N7 e N11 constituídas de 0,005g Ag-NPs, 0,01g Ag-NPs, 0,01g Ag-NPs e Itraconazol 0,03g Ag-NPs e Itraconazol e Itraconazol puro, respectivamente, são as que tiveram resultados pouco satisfatórios, ou seja, houve uma baixa inibição do fungo e seu resultado se assemelha ao do grupo controle (Tabela 13). A amostra de OCO foi testada isoladamente apresentando um resultado satisfatório com atividade inibição significativa. O óleo de Copaíba, *Copaifera multijulga*, apresentou atividade antifúngica para a mesma espécie de fungo em concentração de 0,60 $\mu\text{g/mL}$ que corresponde ao potencial de inibição de 74,32 %, sendo um resultado superior quando comparado a diferentes concentrações de itraconazol e terbinafina [195].

Tabela 13: Resultados dos testes de susceptibilidade para *T. rubrum* utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o diâmetro do halo de inibição (mm) ± desvio padrão de triplicatas.

Concentração da Amostra (µg/mL)	Ágar Sabouraud (Média±DP)
N1	11±1
N2	8,33±0,57
N3	8±0
N4	10±0,57
N5	10±0,57
N6	8±2,64
N7	9±1
N8	-
N9	-
N10	-
N11	9,33±0,57
N12	-
OCO	6±1
NPs-Ag	12,33±0,57
F1-TER	-
F2-ITRA	11,33±0,57
Controle	11,66±0,57

Conforme dados constantes na tabela 14, das três espécies de *Cândida* utilizadas para teste de concentração inibitória, a amostra N9 apresentou efeito inibitório para placas de cultivo com *C. parapsilosis* (Figura 36). Apesar das Ag-NPs não apresentarem nenhuma ação contra *C. parapsilosis*, o uso de 13,1 µg/mL de nanopartícula de prata associadas a proteínas estabilizadoras, apresentou alta atividade antimicrobiana através da atividade inibitória mínima [196; 197].

Considerando-se a classificação da ação de extratos e o consequente tamanho dos halos, proposta por [197], considera-se como inativo aquele que produz um halo menor que 9 mm; 9 a 12 mm indicam extratos ativos, e aqueles halos de 13 a 18 mm, ou maiores, correspondem a extratos muito ativos.

Tabela 14: Resultados dos testes de susceptibilidade para *Candida sp.* utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud dextrose incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o diâmetro do halo de inibição (mm) ± desvio padrão de triplicatas.

Concentração da Amostra (µg/mL)	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
N1	-	-	-
N3	-	-	-
N6	-	-	-
N9	-	50±0	-
N11	-	-	-
N12	-	-	-
OCO	-	-	-
Ag-NPs	-	-	-

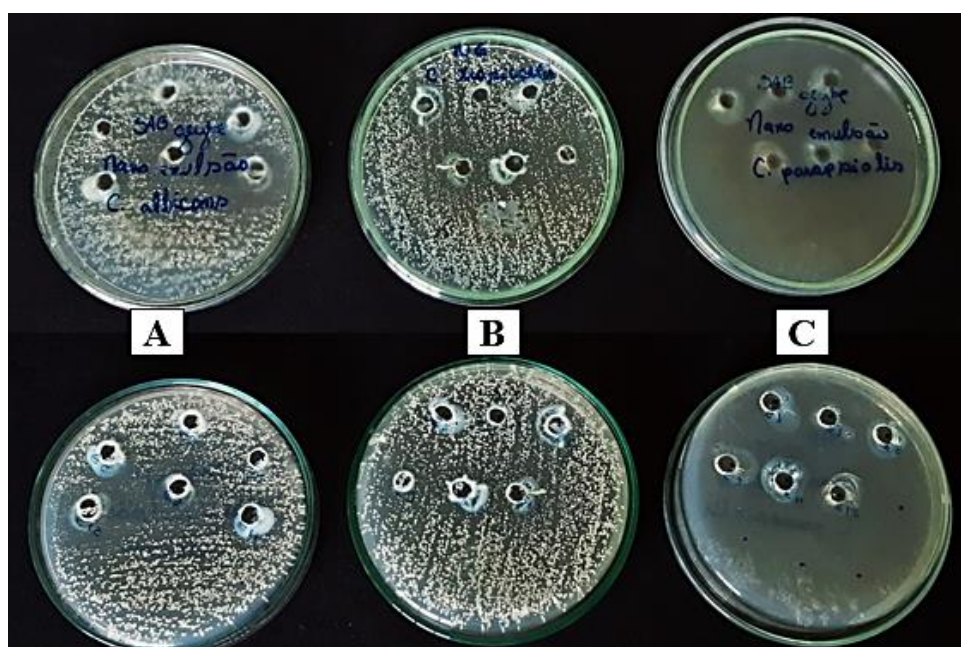


Figura 36: (Fonte do Autor) Resultados dos testes de susceptibilidade para *Cândida albicans* (A), *Cândida tropicalis* (B) e *Cândida parapsilosis* (C) utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Sabouraud dextrose incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.

Conforme observado na tabela 15, as formulações inibiram o crescimento em meio de cultura de *Staphylococcus aureus*, entretanto, a Ag-NPs não apresentou o mesmo efeito (Figura 37). Em estudos utilizando-se óleo de copaíba em Bactérias Gram-Positivas, como *Staphylococcus aureus*, foi observado o extravasamento do conteúdo citoplasmático por influência de tratamento realizado durante 3 horas com óleo de copaíba [198]. O óleo, provavelmente, interage com a parede celular da bactéria sugerindo a ausência dessa atividade

em outro grupo de Bactérias Gram-Negativas relacionada a diferença estrutural entre os dois grupos [198]. Entretanto, *Streptococcus pneumoniae* também pertence ao grupo de bactérias Gram-Positivas e não apresentou sensibilidade pelas amostras em estudo. As bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são bactérias Gram-Negativas que apresentaram resistência as amostras testes. Um dos principais fatores envolvidos na toxicidade seletiva de ação antibacteriana reside na membrana externa da célula bacteriana, bem como em estruturas denominadas porinas, que formam canais na membrana da bactéria. Dessa forma, para atravessar esses canais, um antimicrobiano precisa ser relativamente pequeno e preferencialmente hidrofílico, pois a afinidade com lipídeos e a dimensão do fármaco impedem sua passagem [199]. Os mecanismos de ação dos óleos essenciais contra microorganismos ainda é complexo e ainda não foi completamente explicado [200], entretanto, os óleos essenciais com sua natureza hidrofóbica são capazes de alterar a membrana celular, aumentando a permeabilidade e com isso afetando os mecanismos de transportes [201].

Tabela 15: Resultados dos testes de susceptibilidade para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Mueller Hinton incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o diâmetro do halo de inibição (mm) ± desvio padrão de triplicatas.

Concentração da Amostra (µg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
N1	11±1,1	-	-	-
N3	18±0	-	-	-
N6	11±1	-	-	-
N9	13±1	-	-	-
N11	6±5	-	-	-
N12	15±2	-	-	-
OCO	20±0	-	-	-
Ag-NPs	-	-	-	-

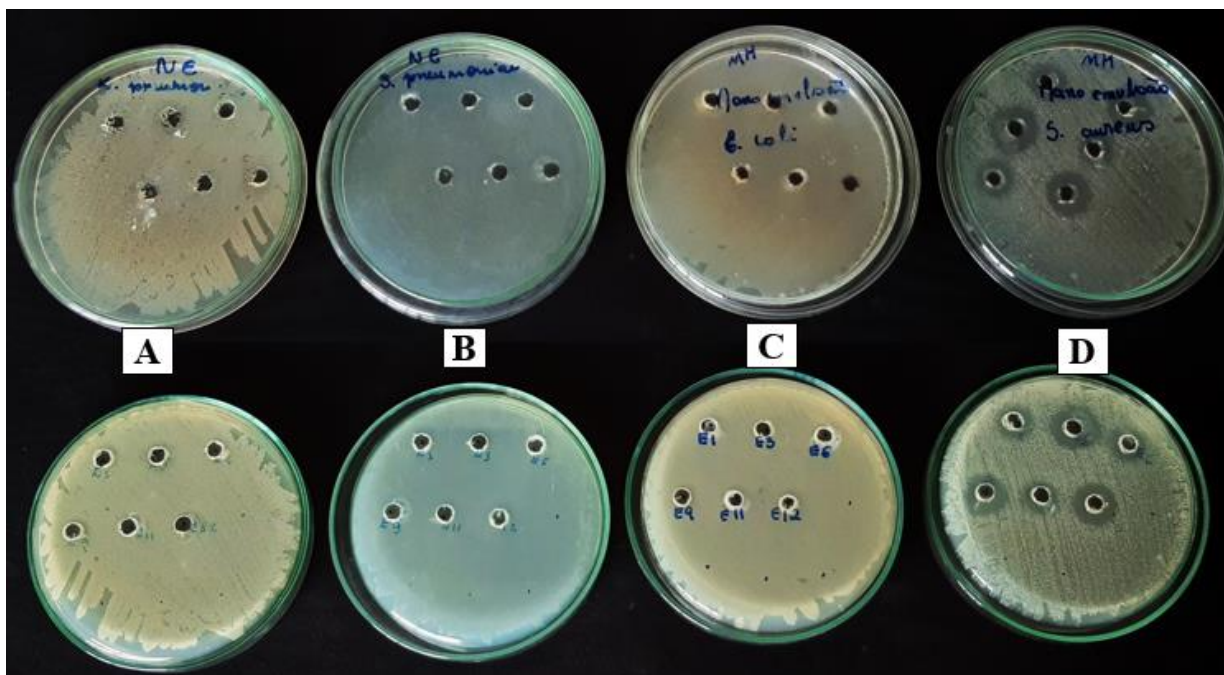


Figura 37: (Fonte do Autor) Resultados dos testes de susceptibilidade para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* utilizando 20 µg/mL de cada formulação apresentada, através da técnica de perfuração em placas de Ágar Mueller Hinton incubadas a 35°C por 24 horas. Os valores apresentam o percentual médio de crescimento ± desvio padrão de triplicatas.

A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba de acordo com [202] não pode ser atribuída a um único componente, pois as características farmacológicas podem ser atribuídas aos diferentes compostos, que de forma sinérgica atuam na atividade antimicrobiana. O β-cariofileno, que é um dos principais constituintes bioativos encontrados no óleo-resina de copaíba é um sesquiterpeno cuja composição perfaz 99,47% dos componentes do óleo e apresenta propriedades medicinais (anti-inflamatórias e antifúngicas) [203; 204].

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Conclusão

Neste trabalho foram produzidas com êxito as Ag-NPs, aplicando a técnica da Combustão Líquida assistida por micro-ondas, bem como as nanorformulações com a incorporação das NPs e derivações com fármacos alopáticos convencionais, Terbinafina e Itraconazol. As nanoestruturas metálicas de prata e nanorformulações foram caracterizadas, objetivando o conhecimento das suas propriedades, estruturas e aspectos físico-químicos de estabilidade.

Diante dos resultados apresentados e discutidos, podemos afirmar que:

- Com o método de síntese de Combustão Líquida Assistida, foi possível desenvolver uma Ag-NPs de dimensão na escala nanométrica e forma apropriada para a aplicação nos testes escolhidos.
- Na caracterização morfológica realizada por meio de MET e MEV, observou-se que as Ag-NPs apresentam forma, composição e tamanho compatíveis, validando a técnica de síntese empregada.
- Foram desenvolvidas nanorformulações estáveis, sendo as NEs, N1, N2, N3 e N4 as quais apresentaram uma maior estabilidade frente aos testes submetidos.
- A observação por microscopia de luz permitiu constatar o comprometimento da estabilidade das NEs sob influência da matéria prima incorporada a nanorformulação, através de processos de cremeação e floculação nas amostras N5, N6 e N7.
- Em testes de inibição com o fungo *trichophyton rubrum*, as amostras contendo em sua composição a Terbinafina inibiu completamente o desenvolvimento do fungo. Quando comparado ao grupo controle, a formulação a base de Itraconazol e as com Ag-NPs apresentaram baixa inibição para o fungo *T. rubrum*, dessa forma caracterizando-se como pouco eficaz.
- Em testes de inibição em fungos leveduriformes *Candida parapsilosi*, a amostra N9 (OCO + Ag-NPs + 100 mg Terbinafina) apresentou-se significativa resposta de inibição.
- As NEs (N1, N3, N6, N9, N11, N12 e OCO) testadas em *Staphylococcus aureus*, tiveram uma resposta de inibição eficaz, entretanto as Ag-NPs isoladas não apresentou efeito de inibição para bactéria Gram-Positiva e Gram-Negativa.
- Os resultados *in vitro* confirmaram o potencial do material elaborado e estudado para aplicações biomédicas futuras.

7.2 Perspectivas Futuras

Apesar das nanoformulações apresentarem eficácia quanto aos testes realizados em microorganismos e baixa fitotoxicidade em *Lactuca sativa*, são necessários a realização de testes de citotoxicidade em células animais para comprovação terapêutica. Além disso, houve a necessidade de melhorar a etapa de caracterização do OCO da espécie utilizada em equipamento de Cromatografia Líquida que quantifique e qualifique seus componentes.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Ramteke, P. W.; Pandey, Avinash C.; Pandey, Himanshu. "Evaluation of antifungal activity of blended cinnamon oil and usnic acid nanoemulsion using candidiasis and dermatophytosis models". *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 18, p. 101062, 2019.
- [2] Grappel, Sarah F.; Bishop, C. T.; Blank, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis". *Bacteriological Reviews*, v. 38, n. 2, p. 222, 1974.
- [3] Sen, S. S.; Rasul, E. S. Correspondence-Dermatophytosis in Assam. 2006.
- [4] Mendez-Tovar, Luis J. "Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor". *Clinics in dermatology*, v. 28, n. 2, p. 185-189, 2010.
- [5] Vander, MR Straten; Hossain, Mohammad A.; Ghannoum, Mahmoud A. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor". *Infectious disease clinics of North America*, v. 17, n. 1, p. 87-112, 2003.
- [6] Täuber, Anja; Müller-Goymann, Christel C. "In vitro model of infected stratum corneum for the efficacy evaluation of poloxamer 407-based formulations of ciclopirox olamine against *Trichophyton rubrum* as well as differential scanning calorimetry and stability studies". *International journal of pharmaceutics*, v. 494, n. 1, p. 304-311, 2015.
- [7] Mukherjee, Pranab K. Pranab K. Mukherjee,¹ Steven D. Leidich,¹ Nancy Isham,¹ Ingrid Leitner,² Neil S. Ryder,² and Mahmoud A. Ghannoum¹. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 1, p. 82-86, 2003.
- [8] Pannu, J., A. McCarthy, A. Martin, T. Hamouda, S. Ciotti, A. Fothergill, J. Sutcliffe. "NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 8, p. 3273-3279, 2009.
- [9] Paião, Fernanda G. "Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs". *FEMS microbiology letters*, v. 271, n. 2, p. 180-186, 2007.
- [10] Khan, Mohd Sajjad Ahmad; Ahmad, Iqbal. "Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and

Trichophyton rubrum". Applied microbiology and biotechnology, v. 90, n. 3, p. 1083-1094, 2011.

[11] Hryniewicz-Gwózdź, Anita. "Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages *in vitro* under drug pressure". Mycopathologia, v. 176, n. 1-2, p. 49-55, 2013.

[12] Tapia, C. "Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment Antifúngicos y resistencia". 2012.

[13] Myc, A., Thomas V., Jeffrey J. Landers, Tarek Hamouda¹ & James R. Baker, Jr. "The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W 60 PC) against clinically important yeast and filamentous fungi". Mycopathologia, v. 155, n. 4, p. 195-201, 2003.

[14] Essa, S.; Rabanel, J.M.; Hildgen, P. "Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly (ethylene glycol) mgrafting density". International Journal os Pharmaceutics, v.411, p. 178-187, 2011.

[15] Lucena, P.A., "Desenvolvimento e caracterização de nanopartícula polimérica contendo Itraconazol". Dissertação (mestrado) Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 2014.

[16] Kumar, Narendra; Mandal, Ajay. "Surfactant stabilized oil-in-water nanoemulsion: stability, interfacial tension, and rheology study for enhanced oil recovery application". Energy & Fuels, v. 32, n. 6, p. 6452-6466, 2018.

[17] Silva, H. R., "Sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo Fluconazol potencialmente ativo contra Dermatomicoses". Tese (Doutorado) Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2018.

[18] Souza, T. "Hidrogel de quitosana em diferentes graus de desacetilação na cicatrização de feridas cutâneas de ratas diabéticas". 2016.

[19] Lucas, R. "Semiologia da pele". Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico. São Paulo: Editora Roca, p. 641-676, 2004.

[20] Bohjanen, K." Estrutura e funções da pele. Dermatologia Clínica". Seção I Bases para diagnóstico e tratamento, 2017.

- [21] Frias, D. F. R., Kozusny-Andreani, D. I. “Isolamento e identificação de fungos associados à dermatofitose e dermatomicose em cães”. Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia, v. 3, n. 2, p. 58-63, 2008. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428100006.pdf>. Acesso em: 01 de outubro de 2010.
- [22] Campos, M. R. D. M. (2004). “Interação de *Trichophyton rubrum* com macrófagos peritoneais de camundongos”. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2004.
- [23] Grisólia, M. E. “Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM”. (Doctoral dissertation), 2019.
- [24] Weitzman, I.; Summerbell, R.C.; “The Dermatophytes”. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995.
- [25] Silveira, H. C. S. “A capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular”. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2007.
- [26] Pereira, F. D. O. “Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum*”, 2012.
- [27] Mimani, P. S. “Micologia: Métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses”. São Paulo: Manole, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v45n1/14952.pdf>. Acesso em 12 de maio de 2020.
- [28] Pigatto, Maiara Cássia; Uchoa, F. T.; Costa, T. D. “Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos”. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 90, p. 86-94, 2009.
- [29] Wang, L., Wenge Yang b , Kai Wang a , Jing Zhu b , Fei Shen c , Yonghong Hu a., “Synthesis and biological evaluation of vinyl ether-containing azole derivatives as inhibitors of *Trichophyton rubrum*”. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 22, n. 14, p. 4887-4890, 2012.
- [30] Ghelardi, E., Francesco C, Sokhna A. G., Sara S., Senesi S., Bulgheroni A., Mailland F., “Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in

Trichophyton rubrum". Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 58, n. 5, p. 2825-2829, 2014.

[31] Brilhante, R. S. N. "Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*". Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33, n. 5, p. 417-425, 2000.

[32] Liu, Z.- H. "Cover Image: *Trichophyton rubrum* penetration of horny cells in dermatophytosis". British Journal of Dermatology, v. 179, n. 4, p. 1016-1016, 2018.

[33] Apodaca, Gerard; Mckerrow, James H. "Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity". Infection and immunity, v. 57, n. 10, p. 3081-3090, 1989.

[34] VuraL, E. "The effects of laser irradiation on *Trichophyton rubrum* growth". Lasers in Medical Science, v. 23, n. 4, p. 349-353, 2008.

[35] Sidrin, J.J.C; Moreira, J.L.B. "Fundamentos Clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica". Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro:1999

[36] Pereira, F. D. O. "Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum*", 2012.

[37] Dos Santos, J. I., Coelho, M. P., & Nappi, B. P. "Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses". Revista Brasileira de Análises Clínicas, 34(1), 3-6, 2002.

[38] Peres, N. T. D. A., Maranhão, F. C. A., Rossi, A., & Martinez-Rossi, N. M. (2010). "Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos". Anais Brasileiros de Dermatologia, 85(5), 657-667.

[39] Carrillo-Muñoz, Alfonso J., Tur-Tur C., Cárdenes, D.C., Estivill D., Giusiano G. "Sertaconazole nitrate shows fungicidal and fungistatic activities against *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Epidermophyton floccosum*, causative agents of *tinea pedis*". Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 55, n. 9, p. 4420-4421, 2011.

[40] Plumb D. V., "Itraconazole", in Plumb DV (ed): Veterinary Drug Handbook, Ames, IA, Blackwell Publishing, 5. Ed., pp 431-433, 2005.

[41] Keller, K. A. "Itraconazole". Journal of Exotic Pet Medicine, v. 2, n. 20, p. 156-160, 2011.

- [42] Lacaz, C. S.; Del Nero, G. “Em Farmacologia”. 6 ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, p. 1118.
- [43] Cazedey, E. C. L., Cazedey, Azevedo, R. C. P., Silva, E. F., e Araújo M. B. “Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE”. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.
- [44] Willems L, van der Geest R, de Beule K. “Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics”. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26:159–169.
- [45] Burapapadh, K., Takeuchi, H., Sriamornsak, P., “Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole”. *asian journal of pharmaceutical sciences*, v. 11, n. 3, p. 365-375, 2016.
- [46] Peeters J, Neeskens P, Tollenaere J.P. “Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4 and 7”. *J Pharm Sci* 2002; 91:1414–1422. Timpe C. Drug solubilization strategies applying
- [47] Leyden J. “Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole”. *J Am Acad Dermatol* 38:S42-S47, 1998
- [48] Ryder N.S. “Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327, a new allylamine antimycotic agente”. *Antimicrob Agents Chemother* 27:252-256, 1985
- [49] Stryer L. “Biosynthesis of membrane lipids and sterols”. *Biochemistry*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995: 685-712
- [50] Darkes, Malcolm JM; Scott, Lesley J.; Goa, Karen L. “Terbinafine”. *American journal of clinical dermatology*, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.
- [51] Donnelly T.M, Rush E.M, Lackner P.A. “Ringworm in small exotic pets”. *Semin Avian Exot Pet Med* 9:82-93, 2000.
- [52] Kathiravan, M. K. “The biology and chemistry of antifungal agentes: a review”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 5678-5698, 2012.
- [53] Parker, J. E. “Resistance to antifungals that target CYP51”. *Journal of Chemical Biology*, v. 7, p. 143-161, 2014.
- [54] Dalla Lana, D. F. “Desenvolvimento de novas entidades químicas e formulações para o tratamento de dermatomicoses”. 2019.

- [55] Mateus, W. D. S. “Avaliação dos efeitos fungistáticos e fungicidas de óleos essenciais em microrganismos causadores de dermatomicoses”. 2016.
- [56] Timpe C. “Drug solubilization strategies applying nanoparticulate formulation and solid dispersion approaches in drug development”. *Pharm Rev* 2010; 13:12–21.
- [57] Dressman, J. B.; Reppas, C. “In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs”. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 11, p. S73-S80, 2000.
- [58] Miller, M. A., Di Nunzio, J., Matteucci, M.E., Ludher, B. S., Williams, R.O.L, e Johnston, k.p. “Flocculated amorphous itraconazole nanoparticles for enhanced *in vitro* supersaturation and *in vivo* bioavailability”. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 38, n. 5, p. 557-570, 2012.
- [59] Mugheirbi, N. A.; Tajber, L. “Mesophase and size manipulation of itraconazole liquid crystalline nanoparticles produced via quasi nanoemulsion precipitation”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 96, p. 226-236, 2015.
- [60] Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. “In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts”. *J Antimicrob Chemother* 51:1223–1229, 2003.
- [61] Baltazar, L. M., Krausz, A. E., Souza, A.C.O., Adler, B.L., Landriscina, A., Musaev T., Nosanchuk, J.D., Friedman, A.J. “*Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation”. *PLoS One*, v. 10, n. 3, 2015.
- [62] Rodrigues, E. R., Nogueira, N.G.P., Zocolo, G.J., Leite, F.S., Januario A.H., Fusco-Almeida, A.M., Fachin, A.L., De Marchi, M.R.R., Dos Santos, A.G., Pietro, R.C.L.R., “*Pothomorphe umbellata*: antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*”. *Journal de mycologie medicale*, v. 22, n. 3, p. 265-269, 2012.
- [63] Pereira, L., Dias, N., Carvalho, J., Fernandes, S., Santos, C., e Lima, N. “Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal- produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*”. *Journal of applied microbiology*, v. 117, n. 6, p. 1601-1613, 2014.
- [64] Paim, L. F. N. A., Dalla Lanab, D.F., Giarettab, M., Daniellib L.J., Fuentefriaa, A.M., Apelb, M.A., Külkamp-Guerreiro, I.C., “*Poiretia latifolia* essential oil as a promising

antifungal and anti-inflammatory agent: Chemical composition, biological screening, and development of a nanoemulsion formulation”. *Industrial crops and products*, v. 126, p. 280-286, 2018.

[65] 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.

[66] Solans, C. “Nano-emulsions”. *Current opinion in colloid & interface science*, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

[67] Ganta, S., Devalapally, H., Amiji, M. “Curcumin enhances oral bioavailability and anti-tumor therapeutic efficacy of paclitaxel upon administration in nanoemulsion formulation”. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 99, n. 11, p. 4630-4641, 2010.

[68] Vianna, R. P. F. “Aplicação de polissacarídeo em emulsão cosmética: análise reológica”. Curitiba, 2008.

[69] Pereira G.G. “Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões”. Ribeirão Preto; 2008. Mestrado [Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade de São Paulo.

[70] Morais, J. M.; Santos, O.D.H.; Nunes, J.R.L.; Zanatta, C.F.; Rocha-Filho, P.A. “W/O/W multiple emulsion obtained by one-step emulsification method and evaluation of the involved variables”. *Journal os Dispersions Science and Technology* [online]. 2008 [acesso em 15 de nov. 2019], 29(1). Disponível em: URL: <http://web-b-eb.scohost.ez54.periodicos.capes.gov.br/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=d9433ce0-5010-4f22-8330-6e1651f94026%40sessionmgr103>

[71] Florence AT, Whittehill D. “The formulation and stability of multiple emulsions”. *International Journal of Pharmaceutics* [online], 1982. [acesso em 11 de nov. 2019]; Disponível em: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/801>

[72] Porto, A. S. “Desenvolvimento de nanoemulsão O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de Zinco”. 2015.

- [73] Narang, J. K. NARANG, Ramandeep S. “Emerging role of nanoemulsions in oral health management”. *International journal of pharmaceutical investigation*, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.
- [74] Do Carmo S., Miranda, M.A.C.M., Freitas, J.V., Ferreira, S.F.A., De Oliveira, L. E.C., De Oliveira, C.M.A., Kato, L., Terezan, A.P., Rodriguez, A.F.R., Faria, F.S.R.D.V, De Almeida, S.C.M., Pereira, M. “Antifungal activity of Copaiba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides spp.*”. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-10, 2019.
- [75] Garcia, A., Yong, Y F., Sandeep, V., Eun Young, H., DiFernando, V., Su He W., Soo Chan L. “Nanoemulsion as an Effective Treatment against Human-Pathogenic Fungi”. *mSphere*, v. 4, n. 6, 2019.
- [76] Azeem, A., Mohammad, R. F. J., Ahmad, R. K., Khar, Z. I., and Sushama T. “Components screening and influence of surfactant and cosurfactant on nanoemulsion formation”. *Current Nanoscience*, v. 5, n. 2, p. 220-226, 2009.
- [77] Mason, T., G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, M. “Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties”. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 18, n. 41, p. R635, 2006.
- [78] Dasgupta, N., Ranjan, S., Gandhi, M. “Nanoemulsion ingredients and componentes”. *Environmental Chemistry Letters*, v. 17, n. 2, p. 917-928, 2019.
- [79] O’Sullivan J.J, Drapala K.P, Kelly A.L, O’Mahony, J.A. “The use of inline high-shear rotor-stator mixing for preparation of highsolids milk protein-stabilised oil-in-water emulsions with different protein: fat ratios”. *J Food Eng* 222:218–225. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.015>, 2018.
- [80] Sadurn, I. N, Solans C, Azemara N, Garcia-Celma MJ. “Studieson the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsificationmethods, suitable for pharmaceutical applications”. *Eur J Pharm Sci*26:438–445, 2005.
- [81] Dorđević, S. M., Radulović, T.S., Nebojsa D.C, Danijela V. Randelovi, D.V., Miroslav M., Savi. C., Krajisnik, D.R., Milić, J.R., Savi S.D. “Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: physicochemical and pharmacokinetic performances”. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 102, n. 11, p. 4159-4172, 2013

- [82] McClements, D.J, Jafari S.M. “General aspects of nanoemulsions and their formulation”. Elsevier, Amsterdam. 2018.
- [83] Onoue, S., Yamada, S., Chan, H. “Nanodrugs: pharmacokinetics and safety”. International journal of nanomedicine, v. 9, p. 1025, 2014.
- [84] Kheawfu K, Pikulkaew S, Rades T, Müllertz A and Okonogi S. “Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems J. Drug Deliv”. Sci. Technol. 46 330–8, 2018.
- [85] Herrero-Vanrell R, Vicario De La Torre M, Andrés-Guerrero V, Barbosa-Alfaro D, Molina-Martínez I T and Bravo-Osuna. “Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview”. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 23 75–102, 2013.
- [86] De Siqueira, L. B. O., Matos, A.P.S., Cardoso, V.S., Villanova, J.C.O., Giumarães, B. C. L.R., Santos, E.P.S., Vermelho, A.B., Santos-Oliveira, R., e Ricci Junior, E. “Clove oil nanoemulsion showed potent inhibitory effect against *Candida spp.*” Nanotechnology, v. 30, n. 42, p. 425101, 2019.
- [87] Larsen, A.T, Ohlsson, A.G, Polentarutti, B,Larsen, A.T., Polentarutti, B., Richard, A.B., Rmaileh, R.A., Dickinson, P.A., Abrahamsson, B., Mullertz, A., J.Ostergaard, J. “Oral bioavailability of cinnarizine in dogs: relation to SNEDDS droplet size, drug solubility and in vitro precipitation”. Eur J Pharm Sci. 2013;48(1–2):339–350.
- [88] Cascon, V. Gilbert, B. “Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne”. Phytochemistry, 55, 773–778, 2002.
- [89] Kobayashi, C., Fontanive, T.O., Enzweiler, B.G., De Bona, L.R., Massoni, T., Apel, M.A., Henriques, A.T., Richter, A. F., Ardenghi, P., & Suyenaga, E.S. “Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats”. Pharmaceutical biology, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.
- [90] Deus, R. J. A., Alves, C. N., & Arruda, M. S. P. ”Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)”. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 13(1), 01-07, 2011.
- [91] Veiga Junior, V.F, Rosas, E.C, Carvalho, M.V, Henriques, M.G, Pinto, A.C. “Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—a comparative study”. J Ethnopharmacol, 112, 248–254, 2007.

- [92] Bastos, A. P. M. R. “Análise cromatográfica, morfológica e molecular da síntese do oleoresina em plantas jovens de *Copaifera multijuga* hayne (fabaceae–caesalpinioideae)”. 2011.
- [93] Montes, L. V., Broseghini, L. P., Andreatta, F. S., Sant’Anna, M. E. S., Neves, V. M., & Silva, A. G. “Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida—uma revisão sistemática”. 2009.
- [94] Dias, D. O., Colombo, M., Kelmanna, R.G., Kaiser, S., Luccaa, L.G., Teixeira, H.F., Limberger, R.P., Veiga Jr., V.F., Koester, L.S. “Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods”. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 154-162, 2014.
- [95] Santana, L. M. B. “Avaliação da atividade anti-inflamatória de sistemas microemulsionados para uso tópico contendo óleo-resina de *Copaifera multijuga* hayne (FABACEAE)”, 2018.
- [96] Neves, J. K. O. “Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*)”, 2013.
- [97] Lucca, L. G. “Nanoemulsões de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne): desenvolvimento tecnológico, estudo de permeação cutânea e avaliação das atividades anti-inflamatória e leishmanicida tópicos”, 2017.
- [98] Bandeira, M. F. C. L.; Oliveira, M. R. B.; Pizzolitto, A. C.; Benatti Neto, C.; J. Bras. Clin. Estet. Odont. 3, 47, 1998.
- [99] Martinez, R. “Atualização no uso de agentes antifúngicos”. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.
- [100] Silva, P. “Farmacologia”. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- [101] Tavares, W. “Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos”. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1996
- [102] Pigatto, M. C., Uchoa, F. T., Costa, T. D. “Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos”. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 90, p. 86-94, 2009.

- [103] Bergold, A. M., Georgiadis, S. “Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão”. *Visão acadêmica*, v. 5, n. 2, 2004.
- [104] Morais, E. S. “Nanopartículas metálicas biossintetizadas por fungos endofíticos isolados de amêndoas de *Bertholletia excelsa ducke*”. 2019.
- [105] Dos Santos, Gouvêa, R. “Nanopartículas de ouro: Uma ferramenta diagnóstica e terapêutica”, 2012.
- [106] Gomez-Gaete, C. “Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacêuticas”. *Revista de Farmacologia do Chile*, v. 7, n. 2, p. 7-16, 2014.
- [107] Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MKJ. “Silver nanoparticle applications and human health”. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-8
- [108] Silva, M. P. P., Aguiar, M. I. F., Rodrigues, A. B., Miranda, M. C., Araújo, M.A.M., Rolim, I. L. T. P., Souza, A, M, A. “Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática”. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 51, 2017.
- [109] Antunes F. S., Dal’Acqua N., Bergmann C. P., Giovanela M. “Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos”. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 9, 20-26, 2013.
- [110] Pompeu, L. D. “Nanopartículas multifuncionais de óxido de titânio e óxido de molibdênio com prata: síntese, caracterização e propriedades antimicrobianas”. 2018.
- [111] Narayanan, Kannan Badri, and Natarajan Sakthivel. "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes." *Advances in colloid and interface science* 156.1-2 (2010): 1-13.
- [112] Bhui, D. K. & Misra, A. “Synthesis of worm like silver nanoparticles in methyl cellulose opolymeric matrix and its catalytic activity”. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 830–835, 2012.
- [113] Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities”. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 145. P. 83-96, 2009.

[114] Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environment Science and Technology*, v. 42, p. 8959-8964, 2008.

[115] Lima MRF, Ximenes CPA, Luna JS, Sant'Ana AEG 2006b. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn 16*: 300-306.

[116] Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima, IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn 16*: 77-82.

[117] ANTUNES, Rossana M. Pessoa et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

[118] OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

[119] Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT 2003. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

[120] BONA, Eliana Almeida Mira De et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

[121] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.

[122] Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev Bras Plantas Med.* 2011;13(1):1-7.

[123] Mendonça DE, Onofre SB. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev bras farmacogn*. 2009; 19(2b):577-81.

[124] LIMA E. O.; Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yues R, Calixto JB (Ed.). *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p. 481-501. Português.

[125] SILVA, Nathália Cristina Cirone. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

[126] MENDONÇA, Davidy Eduardo; ONOFRE, Sideney Becker. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

[127] Rost, N. C. V. “comparação entre métodos de síntese de partículas magnéticas”. *Revista Univap*, v. 22, n. 40, p. 872, 2017.

[128] Costa, A. C. F. M. “Magnetic and structural properties of NiFe₂O₄ ferrite nanopowder doped with Zn²⁺”. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, n. 14, p. e370-e372, 2008.

[129] Costa, A. C. F. M. “Síntese, por reação de combustão em forno de microondas, de nanoferritas de níquel dopadas com cromo”. *Cerâmica*, v. 55, n. 333, p. 78-83, 2009.

[130] Garcia, M. V. D. “Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis”. 2011.

[131] Barros, A. B. S. Moura, T.F.B., Vasconcelos, E.V., Pereira, K.R.O., Dantas, J., Costa, A.C.F.M. “Estudo de diferentes rotas da síntese por reação de combustão em escala piloto para produção de nanocatalisadores magnéticos NiO₅ZnO₅Fe₂O₄”. A 22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais 06 a 10 de Nov. de 2016, Natal, RN, Brasil.

[132] Baker, C. C., Pradhan, A., Shah, S. I. “Metal nanoparticles. In: *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. American Scientific Publishers, 2004. p. 449-473.

Casanova, M. C. R. “Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis”. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- [133] GOBBO, Luciano de Andrade. Aplicação da difração de raios-X e método de Rietveld no estudo de cimento Portland. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [134] Casanova, M. C. R. “Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis”. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [135] Denari, G. B., Cavalheiro, E. T. G. “Princípios e aplicações de análise térmica”. São Carlos: IQSC, p. 40, 2012.
- [136] Svetlichny, G. "Desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de nano partículas lipídicas sólidas contendo óleo de copaíba e alantoína.", 2014.
- [137] Ionashiro, M., Giolito, I. “Nomenclatura, Padrões e Apresentação dos Resultados em Análise Térmica”. Publicação Cerâmica, v.26, p.17-24, São Paulo: USP, 1980. Disponível em: < http://abratec.com.br/?page_id=39>. Acesso em: 26 de março de 2020.
- [138] Haddad, A. S., A.; Attias, M.; Farina, M.; Meirelles, M.; Silveira, M., “Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas”. Departamento de Editoração Eletrônica da Universidade Estadual do Norte Fluminense., 1998.
- [139] Costa, P. R. “Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica”. 2012. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Belo Horizonte.
- [140] Carli, Cynthia de. Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): estabilidade físico-química e avaliação da atividade antioxidante in vitro e em produto cárneo. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [141] Xavier Junior, F.H., “Emulsões de óleo de copaíba: determinação do equilíbrio Lipofílico hidrofílico crítico, propriedades e estabilidade físico-químicas”. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.
- [142] Florence A. R.; Attwood, D. “Princípios físico-químicos em farmácia”. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

- [140] Fronza, T., Campos, A., Teixeira, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. *Acta Farm Bonaerense*, v. 23, n. 4, p. 558-556, 2004.
- [141] Morais, G. G. “Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)”. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [142] Braconi, F. L. “Aplicação cosmética do óleo de canola. In: Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos”. Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos. 1995. p. 6-19.
- [143] Pereira, T. A. “Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêsego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação”. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [144] Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2003. Atheneu, p. 326.
- [145] Batista, R. F. B. D Caracterização e estudo antimicrobiano in vitro de micro e nanofibras de PLA/PVP incorporadas com óleo de copaíba produzidas através da fiação por sopro em solução. 2013.
- [146] Bauer, A. W. “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method”. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- [147] Trajano, V. N. “Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos”. *Food Science and Technology*, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.
- [148] Pieri, F. A. “Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães”. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 3, p. 578-585, 2010.
- [149] Greger, H.; Hadacek, F. “Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice”. *Phytochemical Analysis*, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

- [150] Ostrosky, Elissa Arantes. “Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *Rubus rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos cosméticos”. Diss. Universidade de São Paulo, 2009.
- [151] Correia, T. T. S. “Inativação fotodinâmica antimicrobiana in vitro de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* assistida por Nanocascas de ouro”. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- [152] Shadomy, S.; EspineL-Ingroff, A.; Cartwright, R. Y. “Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. 4th ed. Washington”, DC: American Society for Microbiology, 1985. (Manual of clinical microbiology). p. 991-999.
- [153] Klich, Maren A. "Identification of clinically relevant aspergilli." *Medical mycology* 44. Supplement_1 (2006): S127-S131.
- [154] ARAÚJO, Jorge Corrêa de et al. Determinação dos parâmetros microestruturais de amostras de caulinitas usando o método de refinamento do perfil de difração de raios X. Rem: Revista Escola de Minas, v. 58, n. 4, p. 299-307, 2005.
- [155] Vigneshwaran, N.; Nachane, R.; Balasubramanya, R.H.; Varadajaran, P.V. “A novel onepot green syntesis of stable silver nanoparticles using soluble starch”. *Carbohydrate Reserch*, v. 341, p. 2012-2018, 2006.
- [156] Silva, P. L. “Nanopartículas de prata para utilização como agente antimicrobiano em blendas de amido e poli (álcool vinílico)”. 2016.
- [157] Lopes, W. A., Fascio, M. “Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho”. *Química nova*, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- [158] Khanna, P. K., Singh, N.; Charan, S., Subbarao, V. V. V. S., Gokhale, R., Mulik, U. P. “Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method”. *Materials Chemistry and Physics, Lausanne*, v. 93, p. 117121, 2005.
- [159] Berni Neto, E. A.; Ribeiro, Caue; Zucolotto, V. “Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens”. Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2008.
- [160] Kaucz, A. P. Síntese e caracterização de nanoparticulas metálicas e nanotubos de carbono ancorados em superfície de sílica com potencial utilização em sensores baseados em fibras de luzs. 2017.

- [161] Streck, L. “Preparação e caracterização de sistemas emulsionados contendo benznidazol”. MS thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.
- [162] Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. “Teoria e prática na indústria farmacêutica”. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2. p. 1517, 2001.
- [163] Camargo, M. F. P. “Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica”. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008.
- [164] Oliveira, B. R. “Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*”. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [165] Tadros, T. "Formation and stability of nano-emulsions." *Advances in colloid and interface science* 108, 303-318, 2004.
- [166] Pianovski, A. R. “Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física”. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 249-259, June 2008. Available from <<http://www.scielo.br/scielo>>. access on 16 Ago 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0010>.
- [167] Boock, K. P. “Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* ou cacau *Theobroma cacao*”. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [168] Alves, K. L. M. “Desenvolvimento e avaliação de estabilidade preliminar de emulsões cosméticas utilizando nanopartículas lipídicas sólidas de *murumuru* (*Astrocaryum murumuru*) e ucuúba (*Virola surinamensis*)”. 2018.
- [169] Bernardi, D. S. “Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase”. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [170] Landim, Marcela Guimarães. Estudo da atividade antibacteriana de nanoemulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de sua combinação com ácido anacárdico. 2019.

- [171] Bedin, A. C. "Nanoemulsões contendo benzoilmetronidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro*". 2011.
- [172] Souza, F. M. "Desenvolvimento de microemulsão contendo minoxidil para o tratamento da alopecia." (2017).
- [173] Fronza, T., Campos, A., Teixeira, H. "Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos". Acta Farm Bonaerense, v. 23, n. 4, p. 558-556, 2004.
- [174] Mezdari, H. "Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos". 2010.
- [175] Silva, J.A. "Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados". 2008.
- [176] Brasil. "Guia de estabilidade de produtos cosméticos". Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, v. 1, p. 45. 2004.
- [177] Seibert, J. B. "Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas". 2015.
- [178] Fernandez, P.; Andre, V.; Rieger, J. & Kuhmle, A. "Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. Colloids and Surfaces A". Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.
- [179] Naoui, W. "Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug". Pharmaceutical research, v. 28, n. 7, p. 1683-1695, 2011.
- [180] Grande, C. I-C, and Reis, M.Y.F.A. "Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico."
- [181] Rolim, F. N. A. "Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*).", 2016.
- [182] Ramalho, I. M. M. "Microemulsão contendo Crisina com potencial ação antinociceptiva". Dissertação de Mestrado. Brasil, 2018.
- [183] Santos, Débora Silva. Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de nanoformulações contendo óleo do fruto orbignya phalerata martius. 2015.

- [184] Araújo, G. M. F. “Nanoemulsões de anfotericina B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida”. 2013.
- [185] Araújo, G. M. F. “Nanoemulsões de anfotericina B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida”. 2013.
- [186] Moreira, T.C., “Estudo do óleo essencial da *copaifera multijuga* hayne: aplicações biológicas, microbiológicas e desenvolvimento da nanoemulsão”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Acre, 2015.
- [187] Nunes, J. C. “Influência da nanoemulsão de óleo essencial de limão em filmes à base de gelatina”. Química Nova, v. 41, n. 9, p. 1006-1010, 2018.
- [188] Acevedo-Fani, A.; Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, M. A.; Martín- Belloso, O. “Food Hydrocolloids”, 47, 168, 2015.
- [189] Pires, Viviane G.A, and Márcia R. de Moura. "Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial." Química Nova 40.1 (2017): 1-5.
- [190] Neves, J. K. O. “Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*). 2013.
- [191] Roland, I. "Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design." International journal of pharmaceutics, 263.1-2: 85-94, 2003.
- [192] Bhattacharjee, S. “DLS and zeta potential—What they are and what they are not”. Journal of Controlled Release, 235, 337-351, 2016.
- [193] Landim, M.G. "Estudo da atividade antibacteriana de nanoemulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de sua combinação com ácido anacárdico”. 2019.
- [194] Anton, N., e Vandamme, T.F. "Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences." Pharmaceutical research 28.5 (2011): 978-985.
- [195] Shiu Lin Liu, T.P., Nascimento, C.O., Porto, C.S, Porto, T.S., e Porto, A L.S. “Avaliação da atividade antifungica do óleo de copaíba (*Copaifera multijulga* Haine) frente a isolado de *Trichophyton rubrum* URM 4728 e *Trichophyton tonsurans* URM 4947”, Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/2011/cd/resumos/R0745-2.pdf>. Acesso em 19/ 08/2020.

- [196] Ballottin, D.P.M. “Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos”. 2014.
- [197] Santos, A. O. “Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.
- [198] Alves T. M. A. Biological screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2000; 95(3): 367-73.[Acesso 2017 Ago01]. Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>. Inglês.
- [199] Marangon, C.A. “Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana/gelatina/óleo de copaíba”. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.
- [200] De Oliveira Neves, J. K. “Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery”. *Industrial crops and products*, v. 111, p. 185-192, 2018.
- [201] Burt, S. “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review”. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- [202] Leandro L. M.; Vargas F. S.; Barbosa P. C. S.; Neves J. K. O.; Silva J. Á.; Veiga Junior V. F. Chemistry and biological activities of Terpenoids from *Copaiba* (*Copaifera* spp.) *Oleo renis*. *Molecules*, 2012; 17:3866-3889. [Acesso 2020 Jun 23]. Disponível em :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466849>. Inglês.
- [203] Galúcioa C. S.; Benitesa C. I.; Rodrigues R. A. F.; Maciela M. R. W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. *Química Nova*, 2016; 39(7), 795-800. [Acesso 2020 Jun 23]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160096>. Português.
- [204] Santana, B. B. Ação antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) frente ao agente da mastite bovina: *Staphylococcus aureus* ação antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) frente ao agente da mastite bovina: *Staphylococcus aureus*, p. 1-388–416.

ANEXO



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52024-1	Data da Emissão: 26/02/2016 12:33	Data para Revalidação*: 27/03/2017
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Igor georgios fotopoulos	CPF: 497.996.732-91
Título do Projeto: Fluxos de carbono do ecossistema em florestas tropicais úmidas e sazonalmente secas da Amazônia	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal Rondônia	CNPJ: 04.418.943/0001-90

Cronograma de atividades

#	Descrição de atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Execução do projeto	12/2015	12/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, sendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, todos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exclui o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 02/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ama.gov.br (Serviços on-line - Navegue para Importação ou Exportação de Flora e Fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão seguir por métodos de coleta e armazenamento de captura sustentáveis, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar sempre de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade da população do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da visitação da legislação vigente, ou quando da reatuação, emissão ou taxa descção de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso à componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/legis .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONTATAR O AG-DATAG das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Antes do início dos trabalhos de campo, o pesquisador obrigatoriamente deverá entrar em contato os gestores do REBIO JARU, através do telefone (68) 3423-5406, ou email: joao.gomes@icmbio.gov.br , com o objetivo de agendar as atividades de campo, informando em que região do REBIO Jaru se pretende realizar as coletas e assim saber as regras de uso desta UC. Após a conclusão do projeto, o(a) pesquisador(a) deve enviar os resultados (artigos, monografias, teses, fotos, filmagens ou qualquer outro material resultante desta pesquisa) para compor o acervo da REBIO Jaru. A não entrega constituirá na proibição de futuras autorizações para o pesquisador e demais integrantes, bem como para a Instituição vinculada.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Dione julia ventura da silva	Pesquisadora	054.845.344-07	9873045 ado-PE	Brasileira
2	gabriele netto brilo de souza	Pesquisadora	348.188.922-04	4550260 marinha-PA	Brasileira
3	Alexandro Carlos de Araujo	Pesquisador	408.800.822-72	2789800 522-PA	Brasileira
4	CRISVALDO CASSIO SILVA DE SOUZA	Pesquisador	862.758.110-30	2725644 522-PA	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13973715

