



Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica

Vera Lúcia Sarmento Martins Preto

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientadora

Professora Doutora Maria Filomena Filipe Barreiro

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

2016



Vera Lúcia Sarmiento Martins Preto

Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica

Bragança

2016

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

(Martin Luther King)

Aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram de forma incondicional.

Muito obrigada!

Agradecimentos

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para Deus. Obrigada pela vida, pela família, pelos amigos, por me mostrar que sou mais forte do que penso, por me iluminar e por nunca me abandonar. Estou-Lhe muito agradecida por ter pessoas tão especiais na minha vida.

Aos meus pais, Isabel e José Manuel, à minha irmã, Marta, e aos meus familiares. Possivelmente não teria conseguido realizar-me em tantos níveis sem o vosso amor, carinho e dedicação. Vocês foram, durante todos estes anos da minha vida, os meus maiores incentivadores. Mesmo nos momentos mais difíceis, nunca me deixaram desistir dos meus sonhos, sempre me incentivaram e me mantiveram forte. Espero um dia poder retribuir todo o apoio que me deram. Muito obrigada pelo amor, força, educação, exemplo de vida, por acreditarem sempre em mim e estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida, por me encorajarem todos os dias, por todo o orgulho que sentem por mim e fazerem de mim aquilo que sou hoje. A minha vida não seria a mesma sem vocês! Dedico-vos esta conquista como forma de gratidão. Obrigada por tudo!

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Filomena Filipe Barreiro, pela orientação, apoio, aprendizagem, dedicação, ajuda, disponibilidade, atenção, paciência que teve comigo durante este projeto e por me ter dado a oportunidade de levar a cabo este trabalho.

Obrigada a todos os professores do Mestrado em Engenharia Química da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança que colaboraram para a minha formação científica e a todos que me ajudaram na realização da tese.

À investigadora, Isabel Fernandes, pela disponibilidade, por estar sempre presente, pela paciência e pelo apoio na parte experimental.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho! Obrigada a todos, colaboradores, professores, colegas, amigos de sempre e aos que neste Instituto conheci e que permanecerão para sempre no meu coração, que me fizeram forte para concluir mais esta etapa. Obrigada por todas as lições de vida.

O meu muito obrigada a todos! Sem vocês não teria sido possível.

Este trabalho foi financiado por:

Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



Resumo

As microemulsões (MEs) são sistemas isotrópicos, transparentes, que apresentam boa estabilidade termodinâmica, são fáceis de preparar e possuem um custo associado geralmente baixo. Podem ser utilizadas como veículos de vários princípios ativos, tanto hidrofílicos como lipofílicos. Apresentam uma elevada capacidade de carga, i.e. são capazes de armazenar grandes quantidades do componente alvo, melhorando a biodisponibilidade de certas substâncias ativas. São geralmente formadas por uma mistura de lípido(s), água e tensioativo(s), sendo também muito frequente utilizarem-se co-tensioativos.

O plano experimental do presente trabalho incidiu sobre o desenvolvimento de MEs visando a sua futura utilização como veículo para aplicação tópica de bioativos naturais (não desenvolvido no presente trabalho). Neste contexto, o trabalho apresentado aborda tópicos tais como: Descrição da pele e mecanismos de absorção; Conceitos gerais sobre MEs; e Técnicas para produção e caracterização de MEs.

Para a produção das MEs selecionou-se como sistema químico água pura, azeite refinado e um tensioativo não-iônico (Tween 80), reconhecido por ser não-tóxico e biocompatível. Adicionalmente testou-se o uso de vários co-tensioativos, nomeadamente polietilenoglicol 400, etanol, glicerina, 2-propanol, 1-butanol, Span 80 e Transcutol CG. Para cada combinação azeite + água + tensioativo/co-tensioativo testada foi produzido o respetivo diagrama pseudoternário e definidas as zonas de composição onde se produzem MEs, sistemas com 2 fases, sistemas com 3 fases e onde ocorre a formação de gel.

Para as composições testadas verificou-se que a formação de MEs foi mais favorecida quando se utilizou apenas o sistema base (azeite/água/Tween 80) ou quando se utilizou como co-tensioativo glicerina e Span 80. Contudo, as MEs obtidas foram conseguidas à custa da utilização de um teor elevado do sistema de tensioativo, o que pode restringir a sua utilização tópica. As dificuldades de preparação podem estar relacionadas com a elevada viscosidade do azeite, tal como relatado na literatura. Para contornar esta dificuldade foi testado o efeito da temperatura (ambiente, 40, 60 e 80°C) para o sistema base e o sistema utilizando o co-tensioativo Span 80 (1:1). Neste caso observou-se a diminuição da formação de gel mas não se intensificou a formação de MEs.

Palavras - chave: Microemulsões, azeite, aplicação tópica, diagramas pseudoternários.

Abstract

Microemulsions (MEs) are isotropic systems, transparent, exhibit good thermodynamic stability, are easy to prepare and have a generally low associated cost. They may be used as carriers for various active principles, both hydrophilic and lipophilic. They can present a high load capacity, i.e. they are capable of storing large amounts of the target component, improving the bioavailability of certain active substances. They are generally formed from a mixture of lipid(s), water and surfactant(s) and, very commonly, they use co-surfactants.

The experimental work of this study is focused on the development of MEs seeking its future use as a vehicle for the topical application of natural bioactive (not developed in the present work). In this context, the presented work covers topics such as: Description of the skin and absorption mechanisms; General concepts on MEs; and Techniques for the production and characterization of MEs.

For the production of MEs the selected chemical system was composed by ultrapure water, refined olive oil and a non-ionic surfactant (Tween 80), known to be non-toxic and biocompatible. Additionally, various co-surfactants, particularly polyethylene glycol 400, ethanol, glycerine, 2-propanol, 1-butanol, Span 80 and Transcutol CG were tested. For each combination oil + water + surfactant/co-surfactant tested the respective pseudoternary phase diagram was constructed and the composition areas assigned as: MEs, system with 2 phases, system with 3 phases and gel formation.

For the tested compositions it was found that the formation of MEs was more favoured for the base system itself (oil / water / Tween 80), or when the co-surfactant glycerine and Span 80 was used. However, the obtained MEs have been achieved thanks to the use of a high content of the surfactant system, which can restrict its topical use. The detected preparation difficulties can be related with the high viscosity of olive oil, as reported in the literature. To overcome this constraint, the effect of temperature (ambient, 40, 60 and 80 °C) on the MEs formation was tested with the base system and the system using Span 80 (1:1) as co-surfactant. Although a decrease in the gel formation was observed, the formation of MEs was not intensified.

Keywords: Microemulsions, olive oil, topical application, pseudoternary diagrams.

Índice

1. Motivação e objetivos.....	1
2. Introdução.....	3
2.1. Descrição da pele e mecanismos de absorção	3
2.1.1. Estrutura e funções da pele	3
2.1.2. Mecanismos que determinam a absorção cutânea	6
2.2. Microemulsões	7
2.2.1. Definições e conceitos	7
2.2.2. Componentes do sistema microemulsionado	11
2.2.3. Diagramas de fases ternários e pseudoternários	16
2.2.4. Classificação de Winsor	18
2.3. Técnicas para produção e caracterização de microemulsões	20
2.3.1. Produção de microemulsões	20
2.3.2. Caracterização das microemulsões	21
3. Desenvolvimento experimental	23
3.1. Preparação das microemulsões	23
3.1.1. Materiais gerais	23
3.1.2. Reagentes.....	24
3.1.3. Equipamento.....	25
3.1.4. Descrição das metodologias experimentais para a preparação das microemulsões	25
3.1.5. Construção dos diagramas de fases	28
4. Resultados e discussão	30
4.1. Análise das microemulsões preparadas por sonicação	30
4.2. Análise das microemulsões preparadas pelo método da titulação	32
4.3. Análise das microemulsões preparadas pelo método das misturas individuais... 36	
4.4. Considerações finais sobre o efeito do co-tensioativo e da temperatura	43
5. Conclusões.....	45
6. Referências bibliográficas.....	47
7. Anexos	52

Índice de figuras

Figura 1: Esquema das principais camadas da pele.	3
Figura 2: Tipos de células da epiderme (Adaptado de: Rafeiro, 2013).	4
Figura 3: As cinco camadas da epiderme.....	5
Figura 4: Classificação das MEs quanto às fases dispersa e dispersante (Adaptado de Lawrence et al., 2000).....	9
Figura 5: Representação esquemática dos tensioativos (Adaptado de: González, 2013).	14
Figura 6: Fórmula molecular do Tween 80.....	15
Figura 7: Modelo de um diagrama de fases de uma mistura ternária composta por água, óleo e tensioativo.	18
Figura 8: Representação da classificação de fases de Winsor.	20
Figura 9: Sistema de ultrassons.....	21
Figura 10: Dispersão da luz em função do tamanho das partículas (Adaptado de: Santos, 2015).	23
Figura 11: Diagrama mostrando as linhas de titulação para o sistema ternário contendo Tween 80, água pura e azeite refinado.	29
Figura 12: Registo fotográfico do resultado final das proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1.....	33
Figura 13: Diagrama de fases para o sistema com Tween 80 como tensioativo, azeite refinado como fase lipofílica e água pura como fase aquosa.	34
Figura 14: Gráficos (tamanho de partícula vs. % Volume) relativos a todas as proporções (de 1:9 até 9:1).....	35
Figura 15: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80).	39
Figura 16: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)). .	40
Figura 17: Distribuição de tamanho de partícula em volume relativos aos pontos 1, 2 e 6 para o sistema (água + azeite + Tween 80).	42
Figura 18: Distribuição de tamanho de partícula em volume relativos aos pontos 1 e 6 para o sistema (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)).	43

Índice de figuras dos anexos

Figura A- 1: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:1)).....	52
Figura A- 2: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (2:1)).....	53
Figura A- 3: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:2)).....	54
Figura A- 4: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (1:1)).....	55
Figura A- 5: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (2:1)).....	56
Figura A- 6: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (1:2)).....	57
Figura A- 7: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:1)).....	58
Figura A- 8: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (2:1)).....	59
Figura A- 9: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:2)).....	60
Figura A- 10: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:1)).....	61
Figura A- 11: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (2:1)).....	62

Figura A- 12: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:2)).....	63
Figura A- 13: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:1)).....	64
Figura A- 14: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (2:1)).....	65
Figura A- 15: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:2)).....	66
Figura A- 16: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)).....	67
Figura A- 17: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:2)).....	68
Figura A- 18: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (2:1)).....	69
Figura A- 19: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 40°C).....	70
Figura A- 20: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 60°C).....	71
Figura A- 21: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 80°C).....	72
Figura A- 22: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 40°C).....	73
Figura A- 23: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 60°C).....	74

Figura A- 24: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 80°C).....75

Índice de tabelas

Tabela 1: Escala de EHL usada para classificar os tensioativos.	14
Tabela 2: Lista de matérias-primas e reagentes utilizados.	24
Tabela 3: Lista de equipamentos utilizados.	25
Tabela 4: Tabela de experiências construídas para cada sistema.	28
Tabela 5: Formulação inicial escolhida para a preparação de MEs por sonicação.	30
Tabela 6: Designação atribuída a cada ensaio, temperatura final (depois do ultrassons) das MEs preparadas por sonicação e diferentes tempos de sonicação.	30
Tabela 7: Valor de pH e respetiva avaliação organolética de cada ensaio após o método da sonicação.	31
Tabela 8: Imagens obtidas através do microscópio ótico dos ensaios 1, 2 e 3 para as ampliações de 40x, 100x e 400x.	32
Tabela 9: Tamanho de partícula médio em volume para as razões de 1:9 até 9:1 (μm).	36
Tabela 10: Tabela resumo dos ensaios realizados colocando em evidência a composição para a qual ocorreu a formação de uma fase transparente (ME).	37
Tabela 11: Tamanho de partícula médio em volume dos pontos 1, 2 e 6 para a formulação (água + azeite + Tween 80) (μm).	42
Tabela 12: Tamanho de partícula médio em volume dos pontos 1 e 6 para a formulação (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)) (μm).	43

Lista de abreviaturas

µm	Micrómetro
A/O	Microemulsão simples de água em óleo
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
g	Gramas
h	Hora
i.e.	Isto é
ME	Microemulsão
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
O/A	Microemulsão simples de óleo em água
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogénico
q.b.	Quanto basta
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta

1. Motivação e objetivos

A pele é um órgão complexo, responsável pela defesa primária, regulação da temperatura e função sensorial. É uma barreira eficiente, concebida para minimizar a entrada de substâncias estranhas e de radiação UV para o corpo e evitar a perda de água. A função de barreira da pele tem sido atribuída, principalmente, à organização e composição da camada mais externa da pele, a camada córnea (Lopes, 2014).

As MEs são sistemas isotrópicos, óticamente transparentes, termodinamicamente estáveis apresentando partículas de tamanho inferior a 1,0 μm . Adicionalmente, as MEs têm baixa viscosidade, são obtidas quase que espontaneamente, sem ser necessário utilizar equipamentos sofisticados (Derle *et al.*, 2006; Goheland *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2003; Papadimitriou *et al.*, 2007; Rukmini *et al.*, 2012; Sainorudín *et al.*, 2014).

As MEs são dispersões coloidais de fase única, quer de óleo em água (O/A) ou de água em óleo (A/O), estabilizadas por uma película interfacial de tensoativo e co-tensoativo (opcional). Os sistemas desprovidos de co-tensoativos são os “sistemas ternários” e os sistemas que têm co-tensoativos são os “sistemas pseudoternários” (onde o tensoativo e o co-tensoativo são combinados formando uma única fase). As dispersões são formadas quando o óleo, água e tensoativo/co-tensoativo são misturados em proporções adequadas. Estas dispersões têm baixa viscosidade, baixa tensão interfacial e alta capacidade de solubilização (Gupta *et al.*, 2008).

O agente tensoativo selecionado para a realização deste estudo foi o Tween 80, um tensoativo não-iônico, não-tóxico, ambientalmente amigável, biocompatível e comercialmente barato (Prieto *et al.*, 2013).

Para um estudo sistemático da composição das MEs, é essencial estabelecer o diagrama de fases do sistema, a partir do qual se pode identificar a região de formação das MEs e a sua relação com as outras fases (Damasceno *et al.*, 2011).

No presente contexto, o presente trabalho teve como objetivos gerais efetuar o desenvolvimento de MEs visando a sua futura utilização na aplicação tópica de bioativos naturais e investigar processos para a sua preparação. O sistema químico selecionado é constituído por água pura, azeite refinado, um tensoativo (neste caso um agente tensoativo não-iônico, não-tóxico e biocompatível, o Tween 80) e foram testados vários co-tensoativos (polietilenoglicol 400, etanol, glicerina, 2-propanol, 1-butanol, Span 80 e Transcutol CG).

Como objetivos específicos temos:

- ❖ Desenvolver MEs por seleção dos componentes do sistema, nomeadamente co-tensioativos e teste de formulações;
 - Estudo do método de preparação das MEs;
 - Estudo da variação do co-tensioativo;
 - Estudo da variação da temperatura;
- ❖ Construir diagramas de fases ternários e pseudoternários para obtenção e identificação dos sistemas microemulsionados usando azeite refinado como fase lipofílica;
- ❖ Selecionar a região do diagrama mais apropriada à produção das MEs;
- ❖ Caracterizar as MEs produzidas quanto aos seus aspetos físico-químicos (tamanho de partícula e avaliação organolética).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos de Separação e Reação – Pólo do Instituto Politécnico de Bragança (LSRE-IPB).

2. Introdução

2.1. Descrição da pele e mecanismos de absorção

2.1.1. Estrutura e funções da pele

A pele é um órgão complexo, multifuncional, dinâmico com uma composição diversa e com várias funções biológicas. Tem a capacidade de se adaptar a uma multitude de variações do meio ambiente e às necessidades do organismo que protege, cobrindo-o na sua totalidade. Trata-se de um órgão caracterizado por uma estrutura própria que se apresenta em camadas interdependentes: a epiderme, a derme e a hipoderme, tal como pode ser observado na **Figura 1** (Battisti, 2015; Soares, 2013). A sua função mais óbvia é a de barreira, responsável pela defesa primária do organismo ao minimizar a entrada de substâncias estranhas (Oliveira *et al.*, 2004; Santos, 2015).

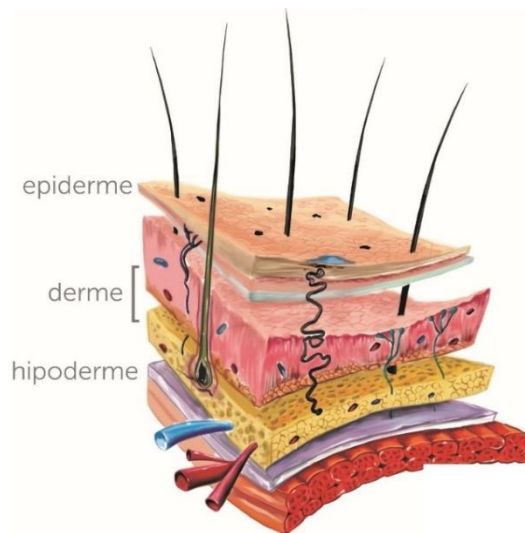


Figura 1: Esquema das principais camadas da pele.

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado, pavimentoso, queratinizado composto por diferentes camadas. A epiderme é a camada do corpo que está em contacto direto com o meio externo, renova-se a cada 14-30 dias dependendo da região do corpo. Existem quatro tipos de células na epiderme: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sendo as mais abundantes os queratinócitos (ver **Figura 2**) (Battisti, 2015; Carvalho *et al.*, 2005).

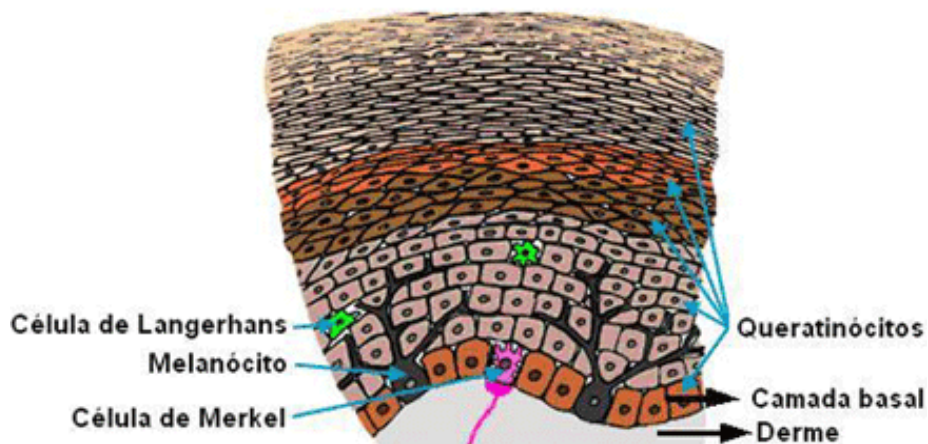


Figura 2: Tipos de células da epiderme (Adaptado de: Rafeiro, 2013).

Os queratinócitos são células epiteliais estratificadas que sofrem diferenciação à medida que se deslocam da camada basal para a superfície da pele (Rosani, 2011). Num sistema dinâmico, essas camadas estão em constante renovação, desde a sua junção com a derme até à superfície cutânea, onde ocorre descamação permanente de numerosas camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelos, chamadas de corneócitos (Battisti, 2015).

Os melanócitos situam-se na camada basal e produzem um pigmento responsável pela coloração da pele e absorção dos raios UV, a melanina (Carvalho *et al.*, 2005; Rafeiro, 2013).

As células de Langerhans encontram-se entre os queratinócitos e têm um papel importante nas reações imunológicas cutâneas (Toscano, 2013).

As células de Merkel são responsáveis pela sensibilidade tátil, localizam-se na parte mais profunda da epiderme e encontram-se apoiadas na membrana basal. Este tipo de células é exclusivo da pele espessa, presente nas superfícies sujeitas a fricção, como é o caso da pele das palmas das mãos e da planta dos pés (Soares, 2013).

De acordo com o grau de maturação dos queratinócitos, e como se pode ver na **Figura 3**, a epiderme é dividida em cinco camadas: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (Battisti, 2015; Carvalho *et al.*, 2005; Rosani, 2011).

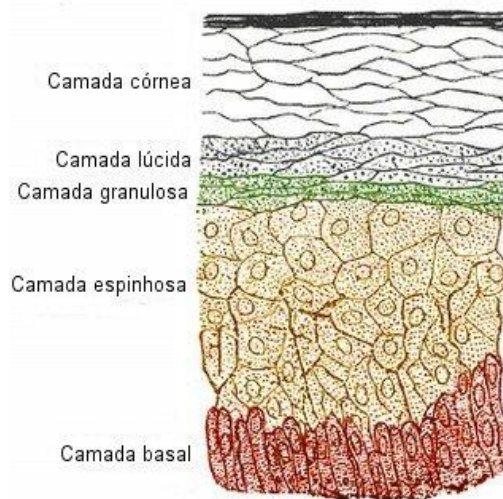


Figura 3: As cinco camadas da epiderme.

A camada basal é a mais profunda, encontrando-se sobre a membrana basal que separa a derme da epiderme (Battisti, 2015; Santos, 2015), dá origem a células diferenciadas da camada espinhosa (mais grossa da epiderme) e da granulosa. É nesta camada e na camada espinhosa, que ocorre a formação dos queratinócitos. A camada lúcida é encontrada entre as camadas córnea e granulosa, onde a pele é mais espessa (Carvalho *et al.*, 2005).

Mais externamente, encontra-se a camada córnea revestida por um fluido lipofílico complexo segregado pelas glândulas sebáceas e pelos corneócitos compostos de células mortas, queratinosas, desidratadas, resistentes ao ataque químico e enzimático (Santos, 2015). Nesta camada os queratinócitos são células mortas e sem núcleo e os melanócitos encontram-se na junção da derme com a epiderme ou entre os queratinócitos da camada basal (Battisti, 2015; Soares, 2013).

A derme é uma camada espessa de tecido fibroelástico denso, é a principal barreira mecânica da pele, contém extensa vascularização, muitos recetores sensitivos, é constituída por um tecido conjuntivo, irregular, composto de colagénio, elastina e glicosaminoglicanos. É dividida em duas regiões: uma localizada em contacto direto com a epiderme, a derme papilar, e outra logo abaixo, a derme reticular (Battisti, 2015; Carvalho *et al.*, 2005). A superfície da derme possui um pH ácido em torno de 4 a 7, havendo um gradiente até ao pH neutro na direção do interior, que se estende até à epiderme (Mehta *et al.*, 2015).

Internamente à derme encontra-se a hipoderme (camada mais profunda da pele) que, já não faz parte da pele mas que é fundamental na união da derme aos órgãos adjacentes e é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que se apoia, contém quantidades variáveis de tecido adiposo nutrindo todo o conjunto de adipócitos, a sua espessura é variável (1 a 4 mm) conforme a parte do corpo (Carvalho *et al.*, 2005; Rosani, 2011; Soares, 2013). Outra das funções da hipoderme é reservar energia e proteger contra o frio. Também confere absorção de impacto, flexibilidade, contém o maior número de vasos sanguíneos da pele e apresenta espessura variável (Rosani, 2011).

A pele possui quatro funções principais (Battisti, 2015; Carvalho *et al.*, 2005):

- ❖ Sensibilidade: é o maior órgão sensitivo do corpo e contém vários recetores para o tato, pressão, temperatura e dor;
- ❖ Funções metabólicas: a hipoderme constitui um reservatório de energia, na forma de triacilgliceróis;
- ❖ Proteção: protege da radiação UV, da perda de água, de agressões mecânicas, químicas e térmicas e atua como barreira física à invasão por microrganismos;
- ❖ Regulação da temperatura corporal: a presença de pêlos e a hipoderme fazem com que o corpo esteja isolado contra a perda de calor. A perda de calor é facilitada pela evaporação do suor na superfície cutânea e pelo aumento do fluxo sanguíneo através da rede vascular da derme.

2.1.2. Mecanismos que determinam a absorção cutânea

Para que haja absorção de agentes terapêuticos é necessário que se verifiquem certas circunstâncias específicas tanto biológicas como físico-químicas, entre as quais (Santos, 2015; Soares, 2013):

- ❖ Estado da pele;
- ❖ Estado de hidratação da camada córnea;
- ❖ Tamanho das moléculas a ser absorvidas (preferível tamanho inferior a 500 Dalton);

- ❖ Solubilidade em água (para a substância penetrar na pele, esta tem de ter alguma solubilidade em água);
- ❖ Lipofilia (para um fármaco permear na pele tem que ter algum carácter lipofílico);
- ❖ Estado físico (líquidos penetram mais facilmente na pele do que os sólidos);
- ❖ Propriedade do veículo (afetam tanto a mobilidade do principio ativo como também as características da pele);
- ❖ Influência dos tensioativos usados;
- ❖ Influência do pH.

As substâncias lipofílicas possuem alto poder de penetração e as hidrofílicas são difíceis de transportar (Formariz *et al.*, 2005).

2.2. Microemulsões

2.2.1. Definições e conceitos

A maioria dos cientistas usa uma definição geral e ampla para descrever as MEs. O termo ME foi introduzido por Hoar e Schulman, em 1943, os quais descreveram esses sistemas como transparentes ou translúcidos, isotrópicos, termodinamicamente estáveis, não irritantes para a pele e com baixa tensão interfacial (Almeida, 2007; Castro, 2014; Damasceno *et al.*, 2011; Estephan, 2012; Figueiredo *et al.*, 2013; Formariz *et al.*, 2005; Júnior *et al.*, 2003; Lakshmi *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2000; Lopes, 2014; Mendonça, 2005; Naoui *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2007; Santos, 2015).

Em suma, as MEs são sistemas óticamente transparentes, isotrópicos, termodinamicamente estáveis e de baixa viscosidade, compostas por uma mistura de óleo, água, tensioativo e por vezes, co-tensioativo. O tamanho de partícula de uma ME varia entre 1 e 200 nm, ao passo que as emulsões leitosas têm tamanho de partícula, geralmente na gama de 1 µm. As MEs formam-se espontaneamente, sob condições corretas, mas requerem uma grande quantidade de tensioativo, o que pode resultar num aumento potencial de irritação (Lakshmi *et al.*, 2013; Lopes, 2014; Mendonça, 2005; Oliveira *et*

al., 2004). A presença de tensioativos aumenta a permeabilidade da membrana celular, possibilitando uma maior biodisponibilidade. Devido à formação espontânea destes sistemas, fatores como a duração da agitação, temperatura, entre outros, podem ser dispensados (Júnior *et al.*, 2003).

As MEs possuem a capacidade de veicular substâncias hidrofílicas e lipofílicas (Damasceno *et al.*, 2011; Fanun, 2009; Lakshmi *et al.*, 2013; Rafeiro, 2013) e têm um custo de preparação geralmente baixo (porque não é necessário nenhum equipamento especializado). O seu equilíbrio é mantido pelo contínuo intercâmbio de substâncias/moléculas entre a fase dispersa e contínua (Santos, 2015). As MEs apresentam uma variedade de estruturas, sendo estas globulares, bicontínuas, cúbicas ou lamelares (Fanun, 2009). O aspeto de uma ME a olho nú é homogêneo e transparente e a sua estrutura não pode ser observada através de um microscópio ótico porque o tamanho das partículas é muito reduzido (Lakshmi *et al.*, 2013). As MEs aumentam a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos. Estas caracterizam-se por possuírem uma tensão superficial muito baixa o que lhes confere alta capacidade de absorção (devido à presença do tensioativo) e de permeabilidade cutânea (Formariz *et al.*, 2005; Santos, 2015).

A possibilidade de formar ME depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensioativo, determinada pela sua estrutura química e por fatores como a temperatura, força iónica e a presença de co-tensioativo (Formariz *et al.*, 2005).

A mistura dos componentes da fase aquosa, fase lipofílica, tensioativo e co-tensioativo na região de ME de um diagrama de fases, é capaz de formar diferentes estruturas internas. Só quando as MEs são muito diluídas é que é possível formar-se uma ME do tipo O/A ou A/O (Damasceno *et al.*, 2011).

De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersa, é possível distinguir três tipos de MEs: água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) e MEs de estrutura bicontínua, estabilizadas por tensioativos de diferentes polaridades. Estes tipos de MEs apresentam as seguintes características (como mostrado na **Figura 4**) (Almeida, 2007; Damasceno *et al.*, 2011; Fanun, 2009; Formariz *et al.*, 2005; Júnior *et al.*, 2003; Klein, 2007; Lakshmi *et al.*, 2013; Lopes, 2014; Mehta *et al.*, 2015; Mendonça, 2005; Naoui *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2007):

❖ MEs do tipo A/O – quando moléculas hidrofílicas estão localizadas no interior de reduzidas partículas esféricas de água e envolvidas por moléculas de tensoativos num meio contínuo lipofílico, a fase aquosa é a interna, dispersa ou descontínua, e a fase lipofílica é a externa, dispersante ou contínua. As moléculas de tensoativos apresentam um EHL na faixa de 3-7. O diâmetro dessas partículas mede, em geral, cerca de 1 e 200 nm;

❖ MEs do tipo O/A – quando moléculas lipofílicas estão localizadas no interior de reduzidas partículas de óleo dispersas e envolvidas por moléculas de tensoativos num meio contínuo aquoso, a fase contínua é a água e a fase dispersa é o óleo. Estas moléculas de tensoativos apresentam um EHL na faixa de 9-13. O diâmetro dessas partículas mede, em geral, entre 10 e 200 nm;

❖ MEs de estrutura bicontínua – tanto o óleo como a água apresentam-se como fases contínuas.

A **Figura 4** mostra a representação esquemática dos três tipos de MEs.

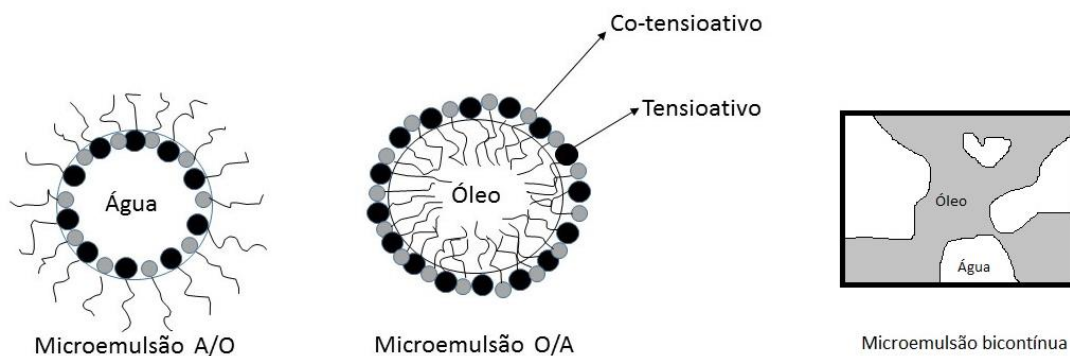


Figura 4: Classificação das MEs quanto às fases dispersa e dispersante (Adaptado de Lawrence *et al.*, 2000).

As MEs do tipo O/A (lipofílicas) têm elevado poder de penetração na pele. Quanto mais fina for a ME, mais fácil se torna a passagem entre as células do tecido cutâneo. As MEs apresentam uma taxa de penetração excelente em camadas profundas da camada córnea, sendo consideradas, como sistemas terapêuticos nanotecnológicos que apresentam grandes possibilidades de promover a permeação, causando uma baixa irritabilidade cutânea (Rafeiro, 2013; Silva *et al.*, 2010).

Se as duas fases contínuas (oleosa e aquosa) estiverem em equilíbrio, estamos perante um sistema bicontínuo. Os sistemas bicontínuos apresentam comportamento plástico, muito vantajoso para administração intravenosa e tópica (Toscano, 2013).

Para se formar uma ME espontaneamente, é necessário que haja mistura de dois líquidos imiscíveis (geralmente, óleo e água) e quantidades adequadas de um tensioativo não-iónico e de um álcool de cadeia média (co-tensioativo). Quando esses dois líquidos são misturados mecanicamente, mantendo a agitação constante, inicialmente, as duas fases tendem a formar partículas de um dos líquidos dispersa no outro. Se for adicionado um tensioativo ao sistema, este estabiliza-se formando um sistema homogéneo com a formação de uma fase interna, dispersa ou descontínua. Sem a adição do tensioativo, geralmente, ocorre separação de fases. Quando a agitação cessa, as partículas tendem a coalescer e os líquidos a separarem-se novamente. Assim, o tempo de vida de uma emulsão pode ser definido como o tempo decorrido desde que as fases estão completamente homogeneizadas, até à separação total do sistema. O “tempo de vida” é maior quanto melhor for a estabilidade do sistema (Almeida, 2007; Castro, 2014; Damasceno *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2007).

A formação das MEs ocorre, em primeiro lugar, com o tensioativo principal a ser adsorvido na interface O/A sendo este que determina a curvatura inicial da fase dispersa. Contudo, a curvatura necessária para que a película de tensioativo atinja a tensão interfacial mínima do sistema final é conferida pela presença do co-tensioativo. A forma das partículas nas MEs pode ser esférica ou não esférica, dependendo da curvatura final da monocamada do tensioativo e da quantidade de óleo incorporada no sistema (Santos, 2015).

Em seguida, apresentam-se algumas vantagens e desvantagens das MEs.

Vantagens (Fanun, 2009; Lopes, 2014; Mendonça, 2005; Santos, 2011; Santos, 2015; Silva *et al.*, 2010):

- ❖ Fácil preparação dado que não requerem muita energia devido a uma melhor estabilidade termodinâmica;
- ❖ Reduzida viscosidade;
- ❖ Excelente capacidade de libertação controlada de compostos ativos;
- ❖ Melhoria das características organolépticas e sensoriais de certos produtos;
- ❖ Biocompatibilidade melhorada;

- ❖ Biodegradabilidade;
- ❖ Maior capacidade de hidratação dos tecidos cutâneos;
- ❖ Maior capacidade de penetração.

Desvantagens (Formariz, 2008; Júnior *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2015; Mendonça, 2005; Santos, 2015):

- ❖ A estabilidade das MEs é influenciada por parâmetros ambientais, tais como a temperatura e o pH, sendo, por vezes, necessário adicionar conservantes, antioxidantes e, em alguns casos, sais tampão;
- ❖ Concentração do tensioativo e co-tensioativo elevadas;
- ❖ Leque de matérias-primas limitado tendo em consideração que os componentes devem ser usados e aceites fisiologicamente.

2.2.2. Componentes do sistema microemulsionado

Estes sistemas são compostos pela combinação de três a quatro componentes essenciais: fase aquosa, fase lipofílica, tensioativo e, quando necessário, co-tensioativo (Almeida, 2007; Castro, 2014; Formariz *et al.*, 2005; Lakshmi *et al.*, 2013; Mendonça, 2005; Naoui *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2004). Estes componentes estão disponíveis em grande número, mas o seu uso na formação de MEs para aplicação tópica é limitado devido à sua toxicidade, irritação potencial e mecanismo de ação. A escolha adequada e as concentrações destes componentes são, assim, muito importantes tendo em vista a aplicação do sistema (Formariz *et al.*, 2005). Os óleos e os tensioativos utilizados na formação de MEs suaves e não-agressivas devem ser biocompatíveis, não-tóxicos e clinicamente aceitáveis (Lakshmi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2015).

2.2.2.1. Fase lipofílica

Os constituintes da fase lipofílica podem ter um papel muito importante como promotores da permeação transdérmica (Figueiredo *et al.*, 2013), sendo a seleção da fase

óleo um passo importante. Este determina a seleção de outros ingredientes nas MEs (principalmente no caso de MEs do tipo O/A) (Stubenrauch, 2009). A fase óleo influencia a curvatura da monocamada do tensioativo a utilizar pela sua capacidade de penetração na pele. Os componentes da fase lipofílica influenciam as MEs nos seguintes aspetos (Santos, 2015):

- ❖ Forma e tamanho das partículas;
- ❖ Permeabilidade através da pele.

Assim, o óleo estudado foi o azeite refinado. O grau de pureza deste óleo deve ser elevado, para prevenir a ocorrência de irritação que pode ser associada a contaminantes presentes em óleos com baixa pureza (Bedin, 2011; Júnior *et al.*, 2003).

A quantidade limite de óleo na ME é cerca de 40 % da massa total, sendo que percentagens de óleo maiores levam à instabilidade termodinâmica (Mendonça, 2005).

2.2.2.2. Fase aquosa

De um modo geral, as MEs utilizam água pura como fase aquosa, principalmente as que se destinam a aplicações na pele (Stubenrauch, 2009). Podem adicionar-se conservantes para garantir a estabilidade microbiológica, uma vez que a mistura de lípidos com água é um ótimo fator para o desenvolvimento de bactérias. O conservante ideal deve ter baixa concentração, ser solúvel em água e não deve ser tóxico (Bedin, 2011; Castro, 2014). A quantidade de água a utilizar é muito importante pois influencia a estrutura interna das MEs (Santos, 2015).

2.2.2.3. Tensioativos

Os tensioativos são moléculas anfifílicas, contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. A região hidrofílica é referida como “cabeça” polar e a região hidrofóbica como a “cauda” não polar (Estephan, 2012; González, 2013; Gupta *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2000; Mendonça, 2005; Rossi *et al.*, 2007), tendo um papel muito importante na formação das MEs (Figueiredo *et al.*, 2013). A escolha do tensioativo adequado é crítica

para a preparação de MEs (Stubenrauch, 2009) e pode ser feita pelo carácter hidrofílico deste (Rossi *et al.*, 2007). Estes devem ter boas características de solubilização na fase interna e, devido ao facto de representarem uma grande fração das MEs, devem ter baixa toxicidade, baixo potencial de irritação e apresentarem boa tolerância cutânea. A baixa tensão interfacial (próxima de zero) pode levar à emulsificação espontânea e a um tamanho de partícula pequeno (Damasceno *et al.*, 2011; Formariz *et al.*, 2005; Santos, 2015). Em alguns casos, não é suficiente recorrer a tensoativos de cadeia simples para reduzir a tensão interfacial e permitir que a ME se forme espontaneamente sem envolver utilização de energia externa (Fanun, 2009; Mehta *et al.*, 2015). Geralmente, e sempre que possível, são utilizados tensoativos de origem natural relativamente aos de origem sintética. A escolha destes depende do tipo de ME a ser preparada (Stubenrauch, 2009).

Os tensoativos devem ter um carácter lipofílico adequado para prever a curvatura correta na região interfacial (Lakshmi *et al.*, 2013). Os tensoativos que apresentam menos problemas de compatibilidade são também os menos sensíveis a mudanças de pH e os que apresentam melhor permeabilidade (Mehta *et al.*, 2015). Quando se deseja uma ME do tipo A/O deve-se utilizar um tensoativo lipofílico e quando se deseja uma ME do tipo O/A deve-se utilizar um tensoativo mais hidrofílico (Castro, 2014; Rossi *et al.*, 2007).

Os tensoativos podem ser classificados pela escala EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) num intervalo de 0 a 20 valores. Usando este sistema, valores inferiores a 10, indicam predominância da parte apolar, tornando-os adequados para a preparação de MEs do tipo A/O e valores superiores a 10 (± 12) apontam para a prevalência da região polar, tornando-os adequados para a preparação de MEs do tipo O/A (Castro, 2014; Formariz, 2008; González, 2013; Júnior *et al.*, 2003; Klein, 2007; Lakshmi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2015; Mendonça, 2005; Santos, 2011; Stubenrauch, 2009;).

Apesar do recurso ao EHL, é muito difícil prever quais as combinações de tensoativo/co-tensoativo e óleo que serão capazes de produzir MEs (Mendonça, 2005).

Os valores de EHL podem ser utilizados para determinar a adequação do tensoativo a um determinado fim, tal como se mostra na **Tabela 1** (González, 2013; Lawrence *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2007).

Tabela 1: Escala de EHL usada para classificar os tensoativos.

EHL	Aplicação geral
1-3	Antiespuma
3-7	MEs A/O
7-9	Dispersantes
9-13	MEs O/A
13-15	Detergentes
15-20	Solubilizante

Existem duas categorias de tensoativos principais (**Figura 5**), dependendo do grau de ionização na solução aquosa: tensoativos iônicos e não-iônicos. Os iônicos subdividem-se ainda em três categorias (aniônicos, catiónicos e anfóteros) (Bedin, 2011; González, 2013; Lawrence *et al.*, 2000; Mendonça, 2005).

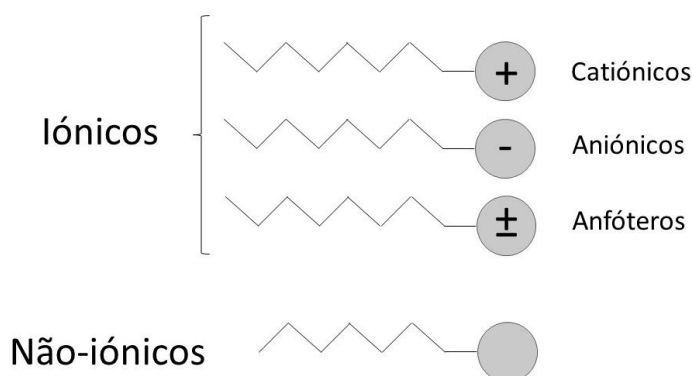


Figura 5: Representação esquemática dos tensoativos (Adaptado de: González, 2013).

Os tensoativos utilizados na preparação de MEs para uso cutâneo são os de natureza não-iônica, por exemplo o Tween 80. Estes são mais versáteis devido às suas boas características de solubilização, não são irritantes, são menos sensíveis às alterações de pH e aumentam a capacidade de retenção cutânea e a permeabilidade (Bedin, 2011; Formariz *et al.*, 2005; Júnior *et al.*, 2003). As MEs formadas por este tipo de tensoativos são mais estáveis e eficazes do que as MEs formadas por tensoativos iônicos dado serem mais hidrofóbicos do que os iônicos (Estephan, 2012). Estas substâncias apresentam

baixa toxicidade e elevada estabilidade química (Damasceno *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013; Santos, 2015).

O Tween 80 tem uma estrutura composta por cadeias insaturadas, o que faz com que estas se dobrem, não permitindo que as cadeias da fase lipofílica penetrem tanto (Santos, 2015). A **Figura 6** mostra a estrutura do Tween 80 que apresenta uma densidade de 1,06 g/mL (Millioli, 2009).

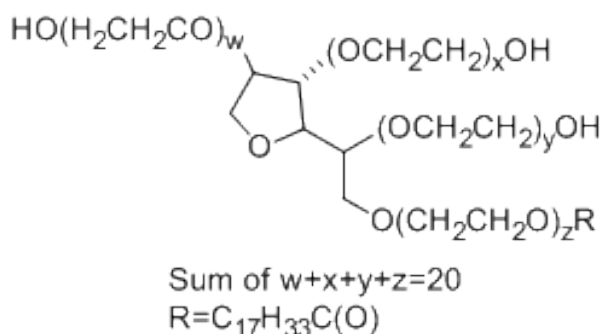


Figura 6: Fórmula molecular do Tween 80.

Na produção de MEs, devem ser tidos em conta três fatores relacionados com o tensoativo (Fanun, 2009; Rukmini *et al.*, 2012; Santos, 2015):

- ❖ Devem-se escolher tensoativos que produzam uma tensão interfacial baixa;
- ❖ A concentração do tensoativo deve ser elevada proporcionando um número de moléculas suficiente para estabilizar as partículas da fase dispersa;
- ❖ A interface deve possuir características de flexibilidade ou de fluidez.

2.2.2.4. Co-tensioativos

Os co-tensioativos são substâncias orgânicas, normalmente, de cadeia curta, responsáveis pela redução da tensão interfacial entre as fases lipofílica e aquosa, necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das MEs, para além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo que a viscosidade do sistema obtido aumente consideravelmente (Fanun, 2009; Formariz, 2008; Gupta *et al.*, 2008; Júnior *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2000; Mendonça, 2005;

Rossi *et al.*, 2007; Rukmini *et al.*, 2012;). O co-tensioativo tem afinidade para as duas fases, tanto para a fase óleo como para a fase aquosa, mas posiciona-se na monocamada interfacial do tensioativo (Stubenrauch, 2009). A distribuição entre a interface e a fase contínua aquosa depende do seu carácter hidrofílico. Em alguns casos, é evitado o uso de co-tensioativos dado que a sua utilização pode promover a diminuição da quantidade de tensioativos utilizada (Damasceno *et al.*, 2011; Santos, 2011; Santos, 2015).

O polietilenoglicol 400, o etanol, a glicerina, o 2-propanol, o 1-butanol, o Span 80 e o Transcutol CG são alguns dos principais co-tensioativos mais utilizados na preparação das MEs (Lakshmi *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2000; Mendonça, 2005; Santos, 2015).

2.2.3. Diagramas de fases ternários e pseudoternários

A representação de um sistema microemulsionado pode ser feita através de diagramas de fases que se classificam em ternários, quaternários e pseudoternários. Após a seleção dos constituintes da formulação, procede-se à construção de um diagrama de fases, assumindo que as MEs são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase lipofílica e tensioativo ou mistura tensioativo/co-tensioativo, sendo que cada vértice do triângulo representa 100% de um dos componentes puros da ME, estando representados no vértice superior a fase aquosa, no vértice esquerdo a fase lipofílica e no vértice direito o tensioativo ou mistura de tensioativo/co-tensioativo. À medida que nos afastamos do vértice de um dos componentes, a sua concentração diminui e aumenta a concentração dos outros dois componentes. A combinação dos constituintes é representada em percentagem (Almeida, 2007; Júnior *et al.*, 2003; Klein, 2007; Lawrence *et al.*, 2000; Mendonça, 2005; Singh *et al.*, 2013).

Os sistemas ternários são, geralmente, construídos a partir dos dados obtidos por titulação ou pela preparação de um número representativo de amostras de diferentes concentrações dos componentes. A vantagem de serem contruídos a partir dos dados obtidos por titulação, é que estes podem ser usados para estudar um amplo número de amostras com diferentes concentrações de uma forma mais rápida. Desta forma, pode-se obter a fórmula global do sistema no momento em que se atingem as características necessárias para obtenção da ME ou desaparecimento de uma das fases. A análise

detalhada dos diagramas de fases mostra que a mistura dos componentes das MEs, em diferentes concentrações, pode gerar vários tipos de agregados nos limites desses diagramas. Como o diagrama de fases quaternário (sistema de quatro componentes) é difícil de interpretar, são construídos diagramas de fases pseudoternários para localizar as diferentes zonas, incluindo a zona de formação das MEs. Os sistemas pseudoternários são os que possuem aspeto de diagramas ternários apesar de serem formados por quatro componentes, agrupando-se dois componentes de modo que a relação tensioativo/co-tensioativo seja constante. Para fazer a leitura das concentrações, em percentagem, de cada componente em qualquer ponto do diagrama de fases pseudoternário, deve-se seguir a orientação horária, ou seja, no eixo oposto ao vértice superior está representada a mistura de tensioativo/co-tensioativo, no eixo oposto ao vértice esquerdo, a fase aquosa e no eixo oposto ao vértice direito, a fase lipofílica. Na preparação de MEs, a construção de diagramas de fases pseudoternários é fundamental para determinar as condições experimentais necessárias para a sua obtenção. Assim, procede-se à caracterização do domínio das regiões de ME e em que proporções os componentes puros se devem misturar para originar outros tipos de estruturas. Um diagrama de fases para sistemas com quatro componentes apresentará regiões distintas e bem definidas, com propriedades termodinâmicas e químicas bem diferentes (Almeida, 2007; Damasceno *et al.*, 2011; Formariz *et al.*, 2005; Goheland *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2003; Neves, 2013; Rossi *et al.*, 2007). Os co-tensioativos, usados para fixar a razão de tensioativo, são tratados como pseudo componentes. A estrutura molecular do co-tensioativo influencia a forma e a extensão da região da ME. Se for um álcool, quanto maior a sua cadeia hidrocarbonada, menor será a região correspondente à ME (Lakshmi *et al.*, 2013; Nóbrega, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2007).

O diagrama de fases descreve assim, em que condições experimentais se obtém MEs e as regiões que limitam a transição entre emulsões, fases separadas, gel e emulsões O/A ou A/O (Oliveira *et al.*, 2004).

A **Figura 7** representa um modelo de diagrama ternário (constituído por fase aquosa, fase lipofílica e tensioativo). O ponto destacado no diagrama corresponde a uma preparação com uma composição de 40% de fase lipofílica, 20% de fase aquosa e 40% de tensioativo. A grande vantagem dos diagramas de fases é que mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama de pontos), bem como as regiões de

domínio dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas). A mistura de água, óleo e tensoativo forma uma grande variedade de estruturas e fases. Estas são facilmente reconhecidas visualmente, devido à sua aparência física. Nas zonas em que as composições são próximas dos eixos binários de água-óleo, como não há tensoativo suficiente para obter uma única fase de ME, diz-se que está fora da região de ME (Klein, 2007).

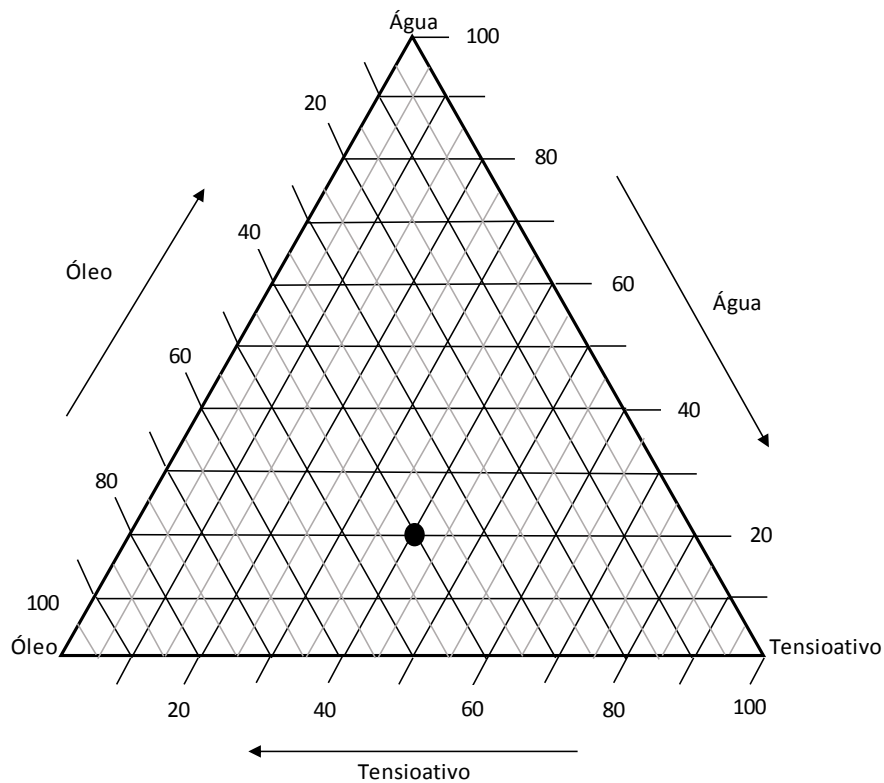


Figura 7: Modelo de um diagrama de fases de uma mistura ternária composta por água, óleo e tensoativo.

2.2.4. Classificação de Winsor

A mistura dos constituintes da ME nem sempre origina um sistema disperso homogêneo, podendo originar diferentes estruturas (Oliveira *et al.*, 2004).

Este método pode ser modificado pela mudança na estrutura do tensoativo ou pela adição de co-tensoativos. Os sistemas propostos por Winsor (1948) definem os vários equilíbrios existentes entre a ME e as fases aquosa e lipofílica (Formariz *et al.*, 2005). De acordo com Winsor, as MEs podem ser classificadas em quatro tipos de sistemas, cada

um com características bem definidas: MEs Winsor do tipo I, II, III e IV. Estes são baseados na quantidade de fases formadas em virtude da quantidade de óleo ou água em excesso (Almeida, 2007; Damasceno *et al.*, 2011; Derle *et al.*, 2006; Estephan, 2012; Formariz *et al.*, 2005; Klein, 2007; Lakshmi *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2007):

- ❖ Winsor do tipo I ocorre quando uma pequena porção da fase lipofílica está em equilíbrio com o sistema microemulsionado, apresentando um excesso de óleo na parte superior do sistema, formando um sistema bifásico (O/A);

- ❖ Winsor do tipo II, também é um sistema bifásico, ocorre quando uma pequena porção da fase aquosa está em equilíbrio com o sistema microemulsionado, apresentando um excesso de água na parte inferior do sistema (A/O);

- ❖ Winsor do tipo III ocorre quando o sistema homogêneo está em equilíbrio com excesso de óleo e de água, formando um sistema bicontínuo de baixa viscosidade (propriedade característica das MEs) em que o óleo é a fase superior, a ME (O/A + A/O, chamada bicontínua) a fase intermédia e a água a fase inferior;

- ❖ Winsor do tipo IV ocorre quando não há excesso de fase aquosa ou lipofílica, formando um sistema homogêneo e monofásico. Este (Winsor do tipo IV) é o foco principal a atingir durante a preparação de um sistema microemulsionado, pois a adição de co-tensioativos não só diminui o valor de EHL dos tensioativos, como também ajusta a conformação do tensioativo na interface para facilitar a formação da ME.

Na **Figura 8** encontram-se representados os 4 sistemas de Winsor (Tipo I, II, III e IV), em foto, obtidos experimentalmente.

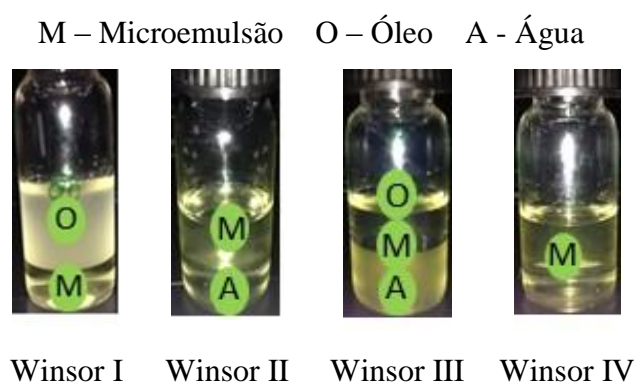


Figura 8: Representação da classificação de fases de Winsor.

2.3. Técnicas para produção e caracterização de microemulsões

As MEs são sistemas muito úteis para a preparação de cosméticos, onde a maioria das formulações têm por base MEs do tipo O/A ou A/O. Estas, geralmente, comportam-se como fluidos Newtonianos e a sua viscosidade é comparada à da água, ou seja, é baixa. Frequentemente, as MEs também podem apresentar propriedades tixotrópicas (Damasceno *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2007).

2.3.1. Produção de microemulsões

Um dos métodos utilizados para a preparação de MEs é o método da sonicação (Battisti, 2015; Mehta *et al.*, 2015; Rosani, 2011; Santos, 2011). Este método ocorre através de dois mecanismos, a aplicação de um campo acústico e a aplicação de ultrassons de baixa frequência. A aplicação de um campo acústico produz ondas interfaciais que fazem com que as partículas da fase dispersa sejam instáveis e a aplicação de ultrassons de baixa frequência provoca a formação e colapso de microbolhas resultantes das flutuações da pressão da onda sonora, o que causa a quebra das partículas por cavitação (Almeida *et al.*, 2008; Bedin, 2011; Santos, 2015). Quando a extremidade da sonda de ultrassons entra em contacto com o meio líquido, ela gera vibrações mecânicas o que dá

origem à cavitação. A intensidade de sonicação é um parâmetro com grande influência no processo, uma vez que o seu aumento diminui o tamanho das partículas. Com o aumento do tempo de sonicação, a temperatura também aumenta, o que pode ser prejudicial no caso de materiais termolábeis ou no caso de reagentes que possam evaporar, como é o caso do etanol. Uma das vantagens dos ultrassons é que esta é uma técnica de fácil utilização à escala laboratorial. Algumas desvantagens incluem: aquecimento da amostra durante o processo; contaminação do produto com componentes da sonda; e dificuldade na execução à escala industrial (Almeida *et al.*, 2008; Battisti, 2015; Bedin, 2011).

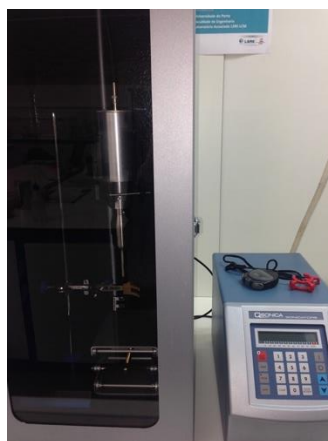


Figura 9: Sistema de ultrassons.

2.3.2. Caracterização das microemulsões

Têm sido empregues várias técnicas para a caracterização de MEs, incluindo a análise organolética e a medição do tamanho de partícula (Castro, 2014; Damasceno *et al.*, 2011; Fanun, 2009; Naoui *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2007; Santos, 2015).

2.3.2.1. Análise das características organoléticas

A análise das características organoléticas das MEs permite avaliar, de imediato, o estado em que a ME se encontra e seguir a sua estabilidade ao longo do tempo (verificar a ocorrência de separação de fases, precipitação e turvação). É a primeira avaliação feita,

mesmo que involuntariamente, quando se aplica na pele uma preparação de uso cutâneo. A avaliação organolética das MEs procura detetar se existem alterações ou problemas que possam afetar a preparação final. As características organoléticas são muitas vezes avaliadas visualmente de acordo com três parâmetros: cor, aspeto e odor (Santos, 2015). Alterações nos parâmetros organoléticos indicam alterações no estado de conservação das preparações. Apesar de esta avaliação ser bastante simples, a existência de problemas ao nível destes parâmetros constitui indicadores seguros de problemas nas matérias-primas no processo de preparação.

2.3.2.2. Determinação do tamanho das partículas

O tamanho de partícula é considerado o parâmetro mais importante para a avaliação da estabilidade de um sistema disperso (Reis, 2014). As técnicas utilizadas para medir o tamanho de partícula são a microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e o método da difração da luz laser (medidores de tamanho de partícula). Estas são usadas quando as MEs possuem um tamanho de partícula não visível ao microscópio ótico (Lakshmi *et al.*, 2013). O método da difração da luz laser é o mais utilizado para medir o tamanho de partícula onde o meio contínuo é um líquido. Trata-se de um método rápido, fácil de usar, flexível, pode ser adaptado para medir amostras de diferentes formas físicas e baseia-se no fenómeno das partículas em suspensão dispersarem a luz em todas as direções com um padrão de intensidade que depende do tamanho das partículas (**Figura 10**) (Battisti, 2015; Bedin, 2011; Santos, 2015). A amostra dispersa é atravessada por um feixe de laser que ilumina as partículas. Quanto menor é o tamanho da partícula, maior é o ângulo de espalhamento que atravessa as partículas (Bedin, 2011).

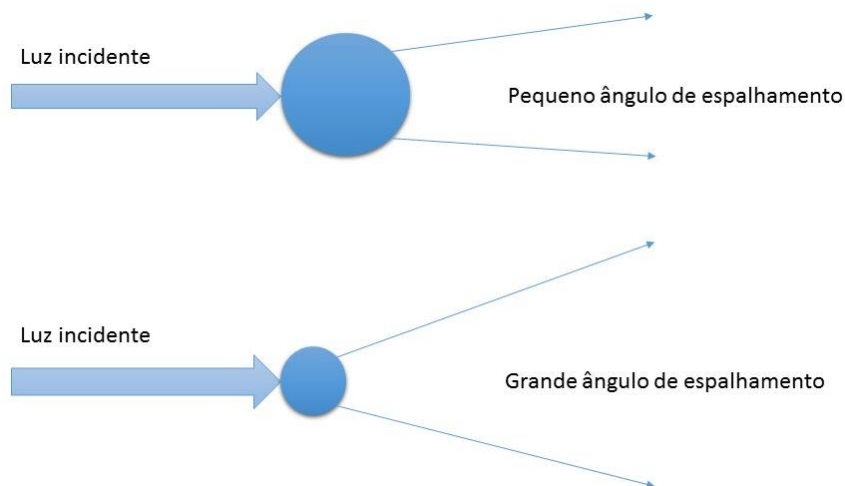


Figura 10: Dispersão da luz em função do tamanho das partículas (Adaptado de: Santos, 2015).

No presente trabalho, os resultados do tamanho de partícula das amostras analisadas são apresentados na forma de uma distribuição estatística. Os tamanhos das partículas são apresentados em percentis. Isto é, o tamanho obtido para D_m representa o tamanho onde $m\%$ das partículas é inferior a esse valor. Por exemplo, D_{90} de $200 \mu\text{m}$ indica que 90% das partículas analisadas têm um tamanho inferior a $200 \mu\text{m}$ (Bedin, 2011; Santos, 2015). O comportamento do tamanho das partículas das amostras analisadas foi obtido pelos parâmetros D_{10} , D_{50} e D_{90} . Estes valores são fornecidos pelo programa computacional utilizado no equipamento *Mastersize Di* podendo ser conferidos no gráfico de cada amostra.

3. Desenvolvimento experimental

3.1. Preparação das microemulsões

3.1.1. Materiais gerais

Para a preparação das MEs foi utilizado o seguinte material:

- ❖ Bureta (25 e 50 mL);
- ❖ Pipetas (5, 10 e 50 mL);

- ❖ Seringas (utilizadas para medições);
- ❖ Termómetro (para medir a temperatura da ME durante a preparação);
- ❖ Vortex;
- ❖ Frascos de vidro;
- ❖ Tabuleiros.

3.1.2. Reagentes

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as matérias-primas e reagentes listados na **Tabela 2**. Na tabela apresenta-se também a sua função. Neste trabalho escolheu-se como tensioativo o Tween 80 (tensioativo não-iónico que apresenta compatibilidade com produtos de utilização cutânea) (Estephan, 2012).

Tabela 2: Lista de matérias-primas e reagentes utilizados.

Matéria-prima	Função	Fornecedor
Etanol	Co-tensioativo	<i>Carlo Erba</i>
Glicerina	Co-tensioativo	<i>Labchem</i>
1 - Butanol	Co-tensioativo	<i>Panreac</i>
2 - Propanol	Co-tensioativo	<i>Panreac</i>
Transcutol CG	Co-tensioativo	<i>Gattefossé SAS</i>
Span 80	Co-tensioativo	<i>Panreac</i>
Polietilenoglicol 400	Co-tensioativo	<i>Aldrich</i>
Água pura	Fase aquosa	_____
Azeite refinado	Fase lipofílica	JCCOIMBRA
Tween 80	Tensioativo	<i>Fagron e Panreac</i>

3.1.3. Equipamento

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os equipamentos listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Lista de equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Ultrassons	QSonica	Q 500
Medidor de pH	WTW	_____
Homogenizador (Ultraturrax)	CAT	<i>Unidrive X 1000</i>
Incubadora	<i>Raypa</i>	_____
Microscópio ótico	<i>Nikon Eclipse</i>	50i equipado com uma câmara digital (<i>Nikon Digital Sight</i>) e com um <i>software</i> de apoio (<i>NIS Elements</i>)
Agitador magnético	VWR	_____
Placa de agitação com aquecimento	VWR	_____
Purificador de água	<i>Direct – Q 3</i> UV	_____

3.1.4. Descrição das metodologias experimentais para a preparação das microemulsões

3.1.4.1. Método da sonicação

A preparação das MEs recorrendo ao método da sonicação consistiu nos seguintes passos (Estephan, 2012; Santos, 2015):

- ❖ Dissolver o tensoativo em 50 mL de água pura, com ligeiro aquecimento;

❖ Depois de dissolvido o tensioativo e de arrefecida a solução juntar o co-tensioativo, se necessário. A curvatura necessária para que o tensioativo atinja a tensão interfacial mínima do sistema é conferida pela presença de um co-tensioativo;

❖ Pesar o óleo;

❖ Emulsificar a preparação juntando o óleo à fase aquosa e ao tensioativo. O sistema é colocado sob agitação e forte tensão cisalhante no ultraturrax, programado para 13500 rpm durante 5 min. Esta agitação garante a formação de partículas de tamanho muito pequeno, aumentando a estabilidade da ME;

❖ Por fim, proceder à sonicação da mistura com o auxílio do ultrassons, programado para uma amplitude de 70% durante 10 min.

Algumas preparações podem ser feitas com 5, 15 e 20 minutos de sonicação em vez de 10 minutos, referidos anteriormente. O objetivo é estudar o efeito do tempo de sonicação no tamanho das partículas.

Após a preparação das misturas, estas são acondicionadas em frascos de plástico e armazenadas à temperatura ambiente. Sensivelmente 15 minutos após a sonicação, foram avaliadas as características organoléticas e o pH das preparações.

3.1.4.2. Método da titulação

Para a realização de todas as razões do diagrama de fases (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1), foi adicionada água com uma bureta à mistura azeite + tensioativo. Esta adição foi feita lentamente e sob agitação continuada. A quantidade de água adicionada final foi de 300 mL. A temperatura manteve-se constante, a 25°C.

3.1.4.3. Método da preparação das misturas individuais

As misturas foram preparadas pesando, numa balança analítica, todos os componentes das formulações (azeite, tensioativo e co-tensioativo) em frascos de vidro com tampa de rosca. Foram escolhidas dezoito composições de forma a cobrir todas as

zonas do diagrama de fases (**Tabela 4**). A massa total de amostra preparada para cada ponto do diagrama foi de 5g. Foram utilizados vários tipos de co-tensioativos (etanol, glicerina, 1-butanol, 2-propanol, Transcutol CG e Span 80), água pura, Tween 80 e azeite. A fim de estudar a influência da presença de um co-tensioativo, foi feita uma mistura de tensioativo/co-tensioativo nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1. A mistura com os três componentes (azeite, água e Tween 80) foi agitada, tendo-se utilizado um tempo suficiente para que a homogeneização da mistura fosse eficaz (Almeida, 2007).

Foram seguidas as seguintes etapas:

- ❖ Adição da quantidade adequada de óleo;
- ❖ Adição da quantidade adequada de tensioativo ou mistura de tensioativo/co-tensioativo (quando aplicável);
- ❖ Agitação mecânica durante 1 min no vortex;
- ❖ Adição da quantidade adequada de água pura com o auxílio da micropipeta;
- ❖ Agitação mecânica durante 5 min no vortex;
- ❖ Quando necessário, o controle de temperatura foi feito colocando os tubos dentro da incubadora à temperatura ambiente, 40°C, 60°C e 80°C.

Decorridas 24h, as misturas foram observadas visualmente, fotografadas e classificadas para efeitos de construção do diagrama ternário ou pseudoternário. Estas foram classificadas em: ME (1 fase transparente), 2 fases, 3 fases, emulsão (1 fase com opacidade) e gel.

Tabela 4: Tabela de experiências construídas para cada sistema.

Ponto	Composição (% massa)		
	Água	Óleo	Tensioativo
1	10	10	80
2	10	20	70
3	10	40	50
4	10	60	30
5	10	80	10
6	20	10	70
7	20	20	60
8	20	40	40
9	20	60	20
10	20	70	10
11	40	10	50
12	40	20	40
13	40	40	20
14	40	50	10
15	60	10	30
16	60	20	20
17	60	30	10
18	80	10	10

3.1.5. Construção dos diagramas de fases

Tendo por base o método da titulação, os diagramas de fases ternários foram construídos partindo de várias misturas binárias dos componentes (tensioativo e óleo), as quais foram tituladas com o terceiro componente (água pura) utilizando buretas e mantendo a mistura titulada com agitação após cada adição para a homogeneização dos componentes. As misturas binárias tensioativo/óleo foram preparadas nas razões 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Para este estudo utilizou-se o sistema constituído por azeite refinado/água pura/ Tween 80.

A água pura foi adicionada gota a gota em volumes de 5 mL, sob agitação, até perfazer 300 mL (tal corresponde a percorrer uma das linhas assinaladas na **Figura 11**). A cada 5 mL de adição, o tipo de sistema formado foi analisado visualmente. Estes pontos foram utilizados para delimitar as diferentes regiões existentes no diagrama. Os resultados são apresentados na **Figura 13**.

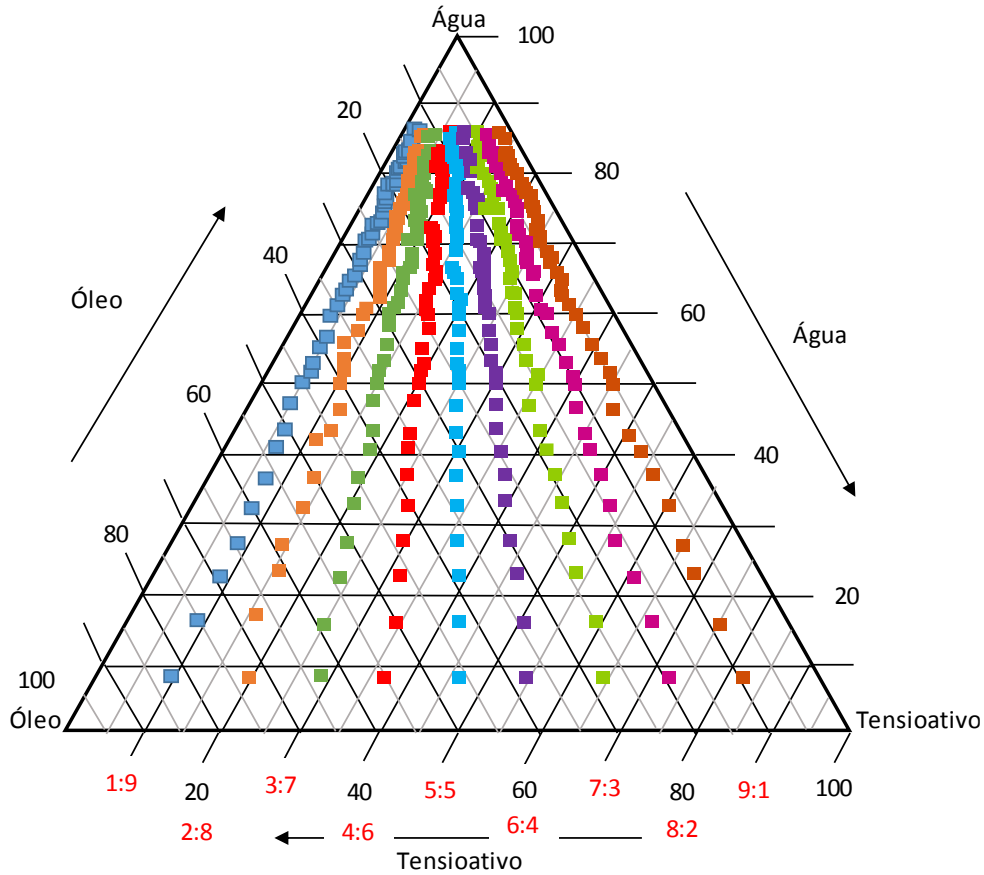


Figura 11: Diagrama mostrando as linhas de titulação para o sistema ternário contendo Tween 80, água pura e azeite refinado.

Para o método da preparação das soluções individuais, as misturas preparadas foram agitadas, deixadas em repouso conforme descrito anteriormente e classificadas para construção do respetivo diagrama de fases.

No caso da utilização do método da sonicação apenas foram realizados ensaios preliminares (não se fez a construção do diagrama de fases).

4. Resultados e discussão

4.1. Análise das microemulsões preparadas por sonicação

Foram realizados cinco ensaios utilizando o ultraturrax e o sonicador (**Tabela 5**). A diferença entre eles foi o tempo de sonicação e o co-tensioativo. A **Tabela 6** (referente aos cinco ensaios realizados) descreve a designação atribuída a cada ensaio, a temperatura final atingida face da utilização do ultrassons e o tempo de sonicação.

Tabela 5: Formulação inicial escolhida para a preparação de MEs por sonicação.

		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			Ensaio 4			Ensaio 5
Função	Matéria-prima	Quantidade (g)			Matéria-prima	Quantidade (g)	Matéria-prima	Quantidade (g)		
Fase lipofílica	Azeite refinado	15,0113	15,0512	15,0096	Azeite refinado	15,0650	Azeite refinado	15,0135		
Tensioativo	Tween 80	15,0176	15,0163	15,0109	Tween 80	15,0031	Tween 80	22,5249		
Co-tensioativo	Etanol	6,0145	6,0166	6,0005	Polietileno glicol 400	6,0012	Glicerina	6,0018		
Fase aquosa	Água pura	q.b. até 150 mL (163,96)	q.b. até 150 mL (113,86)	q.b. até 150 mL (113,98)	Água pura	q.b. até 150 mL (113,93)	Água pura	q.b. até 150 mL (106,46)		

Tabela 6: Designação atribuída a cada ensaio, temperatura final (depois do ultrassons) das MEs preparadas por sonicação e diferentes tempos de sonicação.

Ensaio	Temperatura Final (°C)	Tempo de sonicação (min)
Ensaio 1	65,9	10
Ensaio 2	75,0	10
Ensaio 3	58,5	10
Ensaio 4	76,0	15
Ensaio 5	74,0	15

As misturas correspondentes aos ensaios 1, 2 e 3 contendo Tween 80 como tensioativo, azeite refinado como fase lipofílica e etanol como co-tensioativo, apresentaram cor branca, um aspeto leitoso e homogéneo e sem sedimentos. No ensaio 2, dado a temperatura atingida, é possível que o etanol tenha evaporado. Ao ser substituído pelo Polietilenoglicol 400 (Ensaio 4) o aspeto da emulsão não se alterou e ao ser substituído pela Glicerina (Ensaio 5) ocorreu separação de fases imediata, como se pode verificar pela análise da **Tabela 7**.







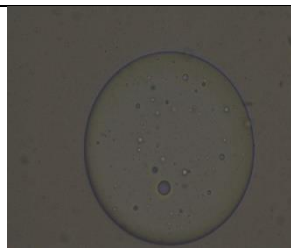
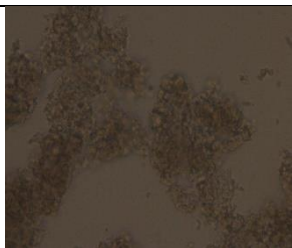
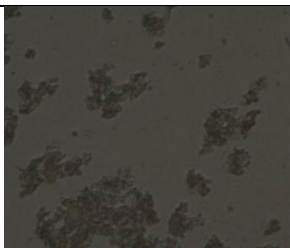
Tabela 7: Valor de pH e respetiva avaliação organolética de cada ensaio após o método da sonicação.

Amostra	pH	Avaliação organolética
Ensaio 1	5,68 (26,4°C)	Aspeto: homogéneo Turvação: sim Formação de sedimentos: não Cor: branca Separação de fases: não
Ensaio 2	5,55 (25,1°C)	Aspeto: homogéneo Turvação: sim Formação de sedimentos: não Cor: branca Separação de fases: não
Ensaio 3	5,52 (25,3°C)	Aspeto: homogéneo Turvação: sim Formação de sedimentos: não Cor: branca Separação de fases: não
Ensaio 4	_____	Aspeto: homogéneo Turvação: sim Formação de sedimentos: não Cor: branca Separação de fases: não
Ensaio 5	_____	Aspeto: homogéneo Turvação: sim Formação de sedimentos: não Cor: branca Separação de fases: sim

Em todos os ensaios (1, 2, 3, 4 e 5) ocorreu formação de espuma durante a emulsificação com o ultraturrax. As misturas preparadas foram analisadas ao microscópio

ótico para confirmar se eram ou não ME. Foi possível verificar que não eram MEs mas sim emulsões normais dado o tamanho de partícula (**Tabela 8**).

Tabela 8: Imagens obtidas através do microscópio ótico dos ensaios 1, 2 e 3 para as ampliações de 40x, 100x e 400x.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Ampliação de 40 x			
Ampliação de 100 x			
Ampliação de 400 x			

No ensaio 1, a partícula de maior dimensão mede 67,36 μm e a partícula de menor dimensão 0,84 μm . No ensaio 2 a partícula de maior dimensão mede 11,79 μm e a partícula de menor dimensão 0,842 μm .

4.2. Análise das microemulsões preparadas pelo método da titulação

Para as proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4 e 7:3 ocorreu separação de fases. Para a proporção 8:2 observou-se uma emulsão branca leitosa e para a proporção 9:1 uma emulsão de cor amarela, quase transparente, como se pode ver pela análise da **Figura 12**.

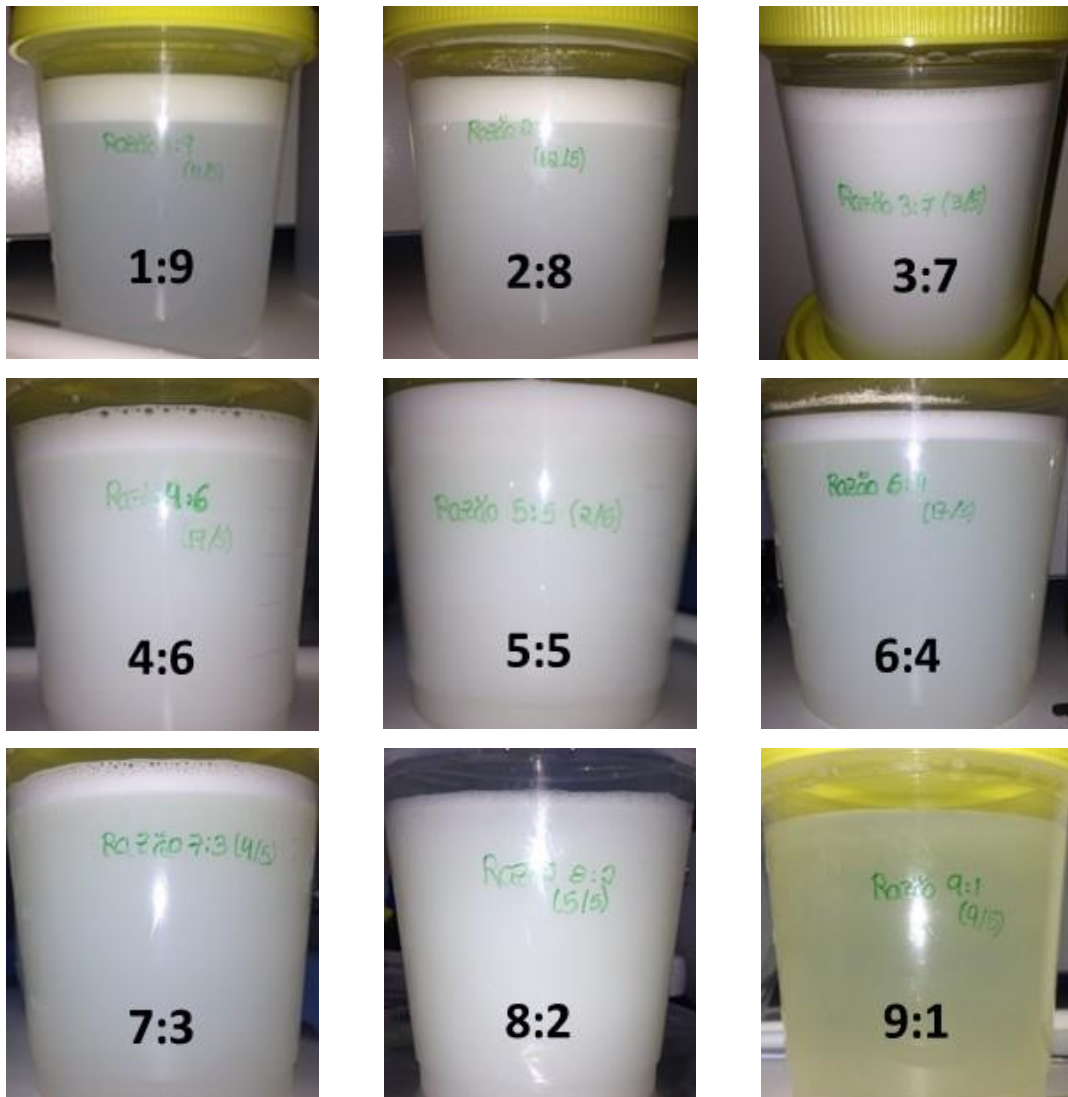


Figura 12: Registo fotográfico do resultado final das proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1.

Com base nos resultados obtidos foi construído o diagrama de fases que é apresentado na **Figura 13**.

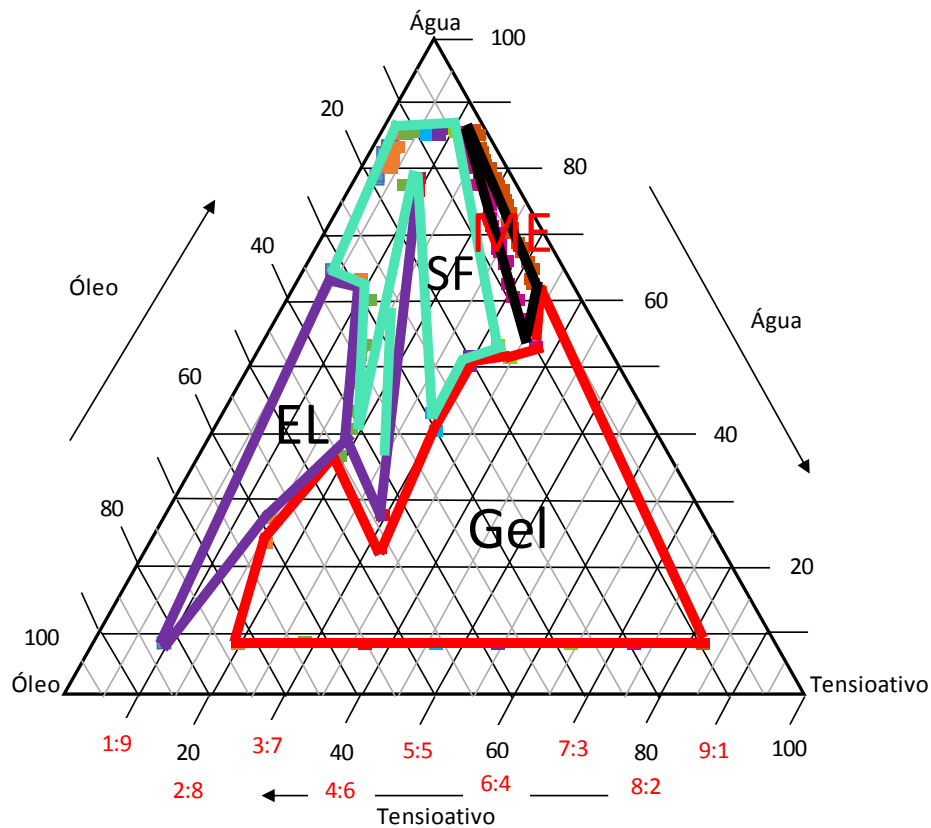


Figura 13: Diagrama de fases para o sistema com Tween 80 como tensioativo, azeite refinado como fase lipofílica e água pura como fase aquosa.

Os sistemas que apresentavam aspeto leitoso e líquido foram denominados de ‘Emulsão Líquida’ (EL), os sistemas em que ocorreu separação de duas fases foram denominados de ‘Separação de Fases’ (SF), os sistemas que apresentavam um aspeto altamente viscoso foram denominados de ‘Gel’ e os que apresentavam aspeto amarelado e translúcido foram denominados de ‘Microemulsão’ (ME).

Para as misturas preparadas foi analisado o tamanho de partícula para todas as proporções (de 1:9 até 9:1) no equipamento *Mastersize Di* localizado no Brigantia *Ecopark*. A **Figura 14** mostra as distribuições de tamanho e a **Tabela 9** resume os valores médios em volume para as distribuições obtidas.

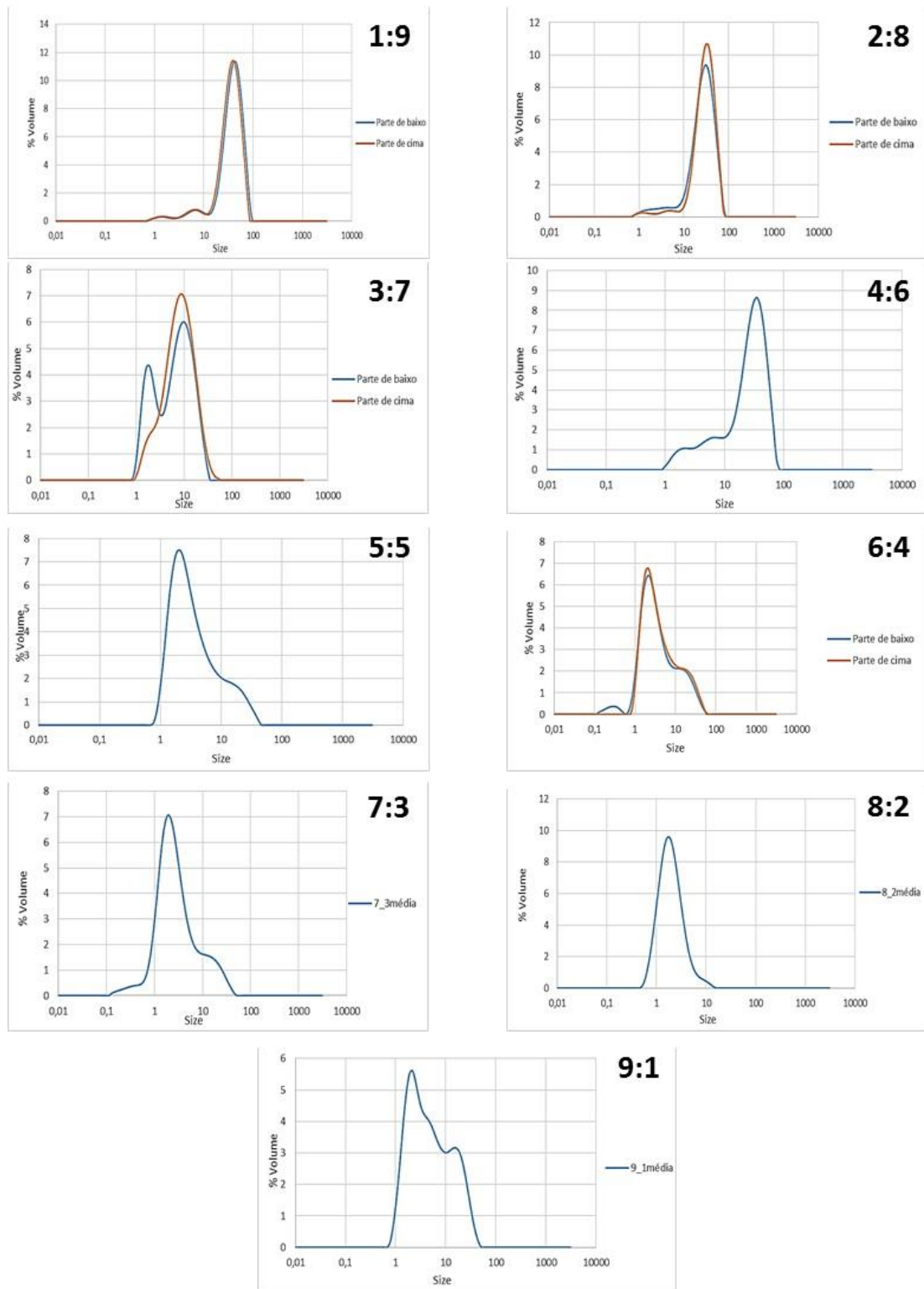


Figura 14: Gráficos (tamanho de partícula vs. % Volume) relativos a todas as proporções (de 1:9 até 9:1).

Tabela 9: Tamanho de partícula médio em volume para as razões de 1:9 até 9:1 (μm).

		Média								
		1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1
Dx (10)	Cima:	15	15,2	2,78	4,24	1,46	1,53	1,08	1,03	1,59
	Baixo:	15,5	10,2	1,69			1,33			
Dx (50)	Cima:	37,5	32	8,44	28,6	3,07	3,52	2,58	1,96	4,49
	Baixo:	41	29,1	7,15			3,25			
Dx (90)	Cima:	62,2	55,3	19,9	54,8	15,2	20,8	13,4	4,17	20,9
	Baixo:	67,9	54	18,2			18,9			

4.3. Análise das microemulsões preparadas pelo método das misturas individuais

Os diagramas de fases ternários e pseudoternários foram obtidos para as misturas preparadas com diferentes proporções de água pura/azeite refinado/Tween 80. O componente tensoativo foi também modificado com a presença de um co-tensoativo (etanol, glicerina, 1-butanol, 2-propanol, Transcutol CG e Span 80). Quando foram utilizados co-tensoativos, a proporção de tensoativo para co-tensoativo foi de 1:1, 1:2 e 2:1. Foram usadas diferentes temperaturas (ambiente, 40°C, 60°C e 80°C).

De uma forma geral verificou-se que quando se utiliza um co-tensoativo, nem sempre existe formação de ME. Verificou-se ainda que a utilização de temperaturas superiores à temperatura ambiente favoreceu a formação de uma zona correspondente a ME. Adicionalmente verificou-se que as MEs foram formadas para concentrações elevadas de tensoativo. A **Figura 15 e 16** mostra, a título de exemplo, os diagramas obtidos para a formulação base (sistema: água + azeite + Tween 80, diagrama ternário) e para uma formulação contendo glicerina (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%), diagrama pseudoternário). Os restantes diagramas de fases são apresentados em anexo. A **Tabela 10** resume os resultados obtidos para os sistemas químicos estudados colocando em evidência a formação de pontos com uma única fase (MEs) e respetiva composição.

Tabela 10: Tabela resumo dos ensaios realizados colocando em evidência a composição para a qual ocorreu a formação de uma fase transparente (ME).

Sistema Químico	Temperatura (°C)	Formação de 1 fase (ME)	Composição
Água + azeite + Tween 80	Ambiente	Sim	10/10/80 10/20/70 20/10/70
Água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)	Ambiente	Sim	6/10/84 16/10/74
Água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:1)	Ambiente	Sim	10/10/80
Água + azeite + Tween 80/Glicerina (2:1)	Ambiente	Sim	10/10/80
Água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Etanol (1:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Etanol (2:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Etanol (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/1-butanol (2:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/2-propanol (2:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (2:1)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)	Ambiente	Sim	10/10/80 10/20/70
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:2)	Ambiente	Não	_____
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (2:1)	Ambiente	Sim	10/10/80 10/20/70
Água + azeite + Tween 80	40	Sim	10/10/80 20/10/70
Água + azeite + Tween 80	60	Sim	10/10/80 20/10/70
Água + azeite + Tween 80	80	Sim	10/10/80 20/10/70
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)	40	Sim	10/10/80 10/20/70
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)	60	Sim	10/10/80 10/20/70
Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)	80	Sim	10/10/80 10/20/70

A presença de etanol nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, de glicerina nas proporções 1:1 e 1:2, de 1-butanol nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, de 2-propanol nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, de Transcutol CG nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, de Tween 80 a 60°C e 80°C e de Span 80 na proporção 1:1 a 60°C e 80°C evitaram formação da região de 'gel'. Tal observação está de acordo com a literatura que refere que a fase 'gel' tende a desaparecer quando é introduzido no sistema um álcool de cadeia curta com até quatro átomos de carbono (Syed *et al.*, 2014).

Em síntese, e de uma forma geral, quando se utilizaram temperaturas superiores à ambiente (com a exceção de 40°C) verificou-se que se evitou a formação de gel. Adicionalmente, conclui-se que o aumento da temperatura incrementa a formação de pontos com uma única fase (MEs).

De notar também que no decurso do tempo de espera entre a preparação a uma dada temperatura e a classificação das misturas preparadas ocorreu, em alguns dos casos, alteração da tipologia. Se as amostras estivessem em equilíbrio, como elas são estáveis, deviam manter-se mesmo depois de arrefecer, como não mantêm é porque não atingiu o equilíbrio termodinâmico.

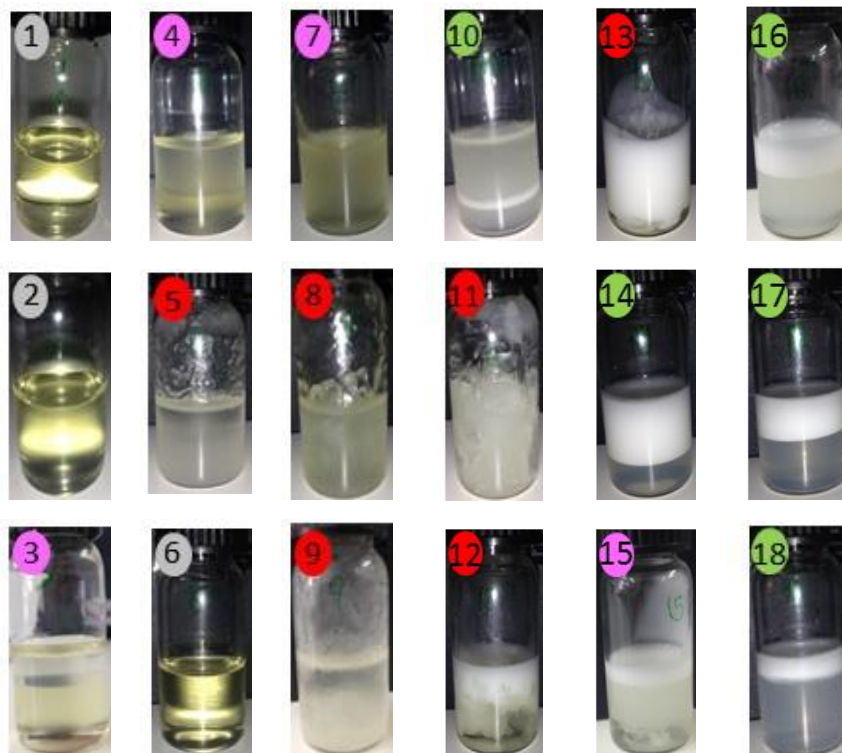
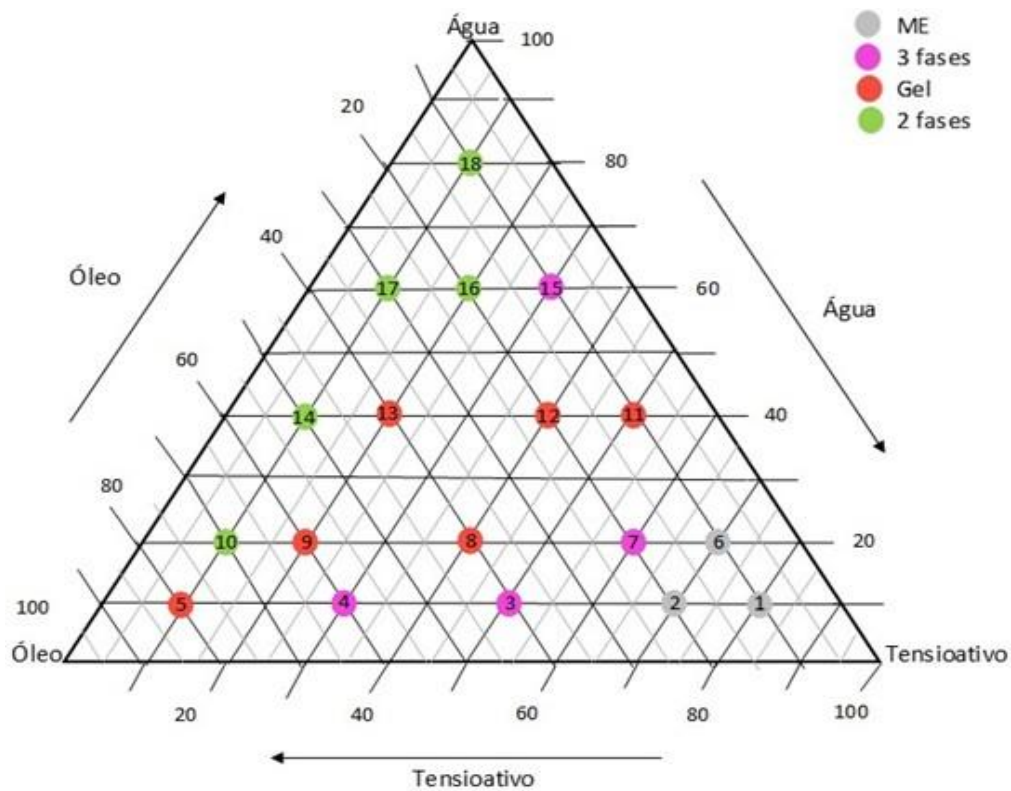


Figura 15: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80).

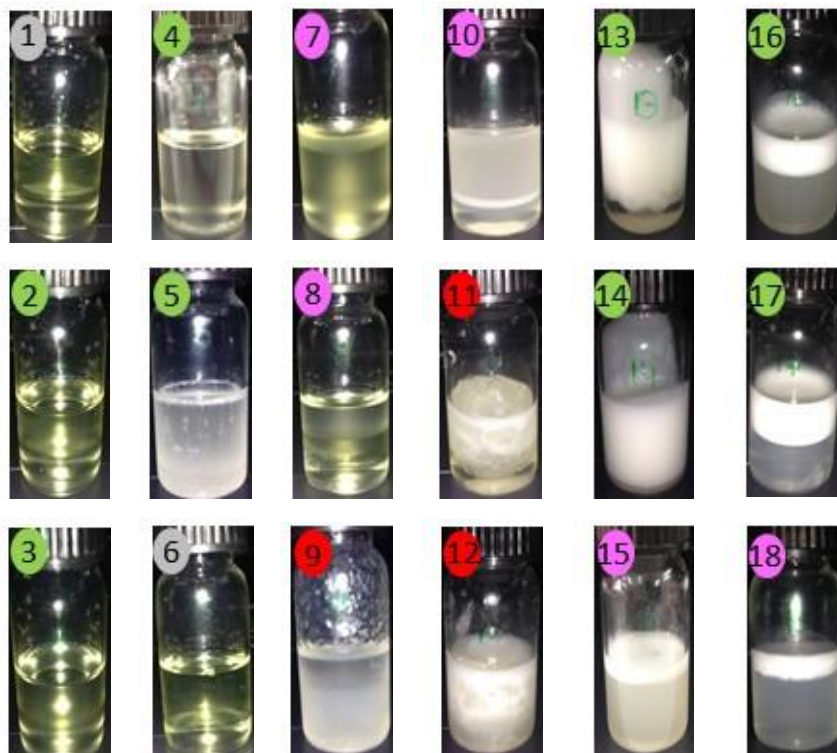
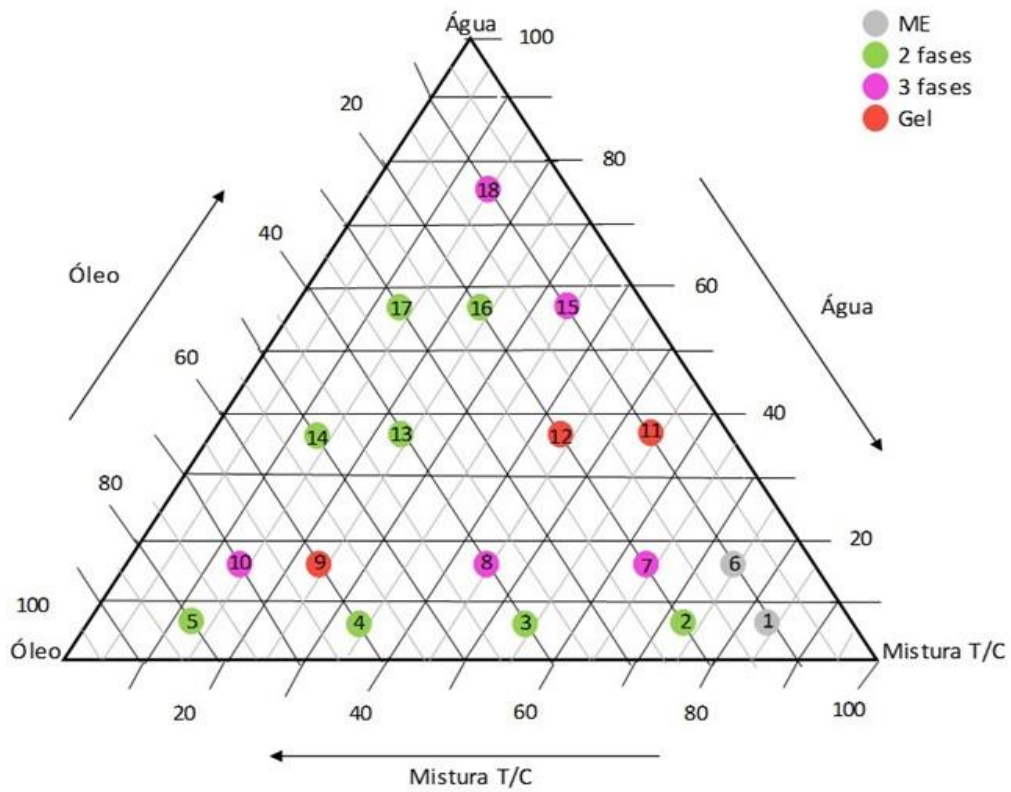


Figura 16: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)).

Após ter-se identificado os pontos para os quais havia formação de uma fase transparente única (ME) (1, 2 e 6) (**Figura 15**) procedeu-se à sua análise no medidor de tamanho de partícula. A **Figura 17** mostra as distribuições em volume obtidas para o sistema (água + azeite + Tween 80) e os resultados dos valores médios estão representados na **Tabela 11** (neste caso observaram-se 3 pontos: 1, 2 e 6). Adicionalmente, a **Figura 18** mostra as distribuições em volume obtidas para o sistema (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)) e a **Tabela 12** representa os valores médios (neste caso observaram-se 2 pontos: 1 e 6).

Dado a quantidade pequena de mistura preparada houve dificuldades em efetuar uma medição rigorosa. Adicionalmente, a formação de espuma constituiu também um problema sendo que o pico centrado próximo dos 1000 μm pode ser associado a este fenómeno (ver, por exemplo, o pico nos gráficos das análises ao ponto 1 e 6 na **Figura 17** e o pico no gráfico da análise ao ponto 1 na **Figura 18**), o que pode justificar os valores elevados obtidos para o Dx (50) e Dx (90) na **Tabela 11** e **Tabela 12**.

Dos pontos analisados o que está na gama de tamanho de partícula que pode ser considerado ME é o correspondente ao ponto 6 da formulação (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)).

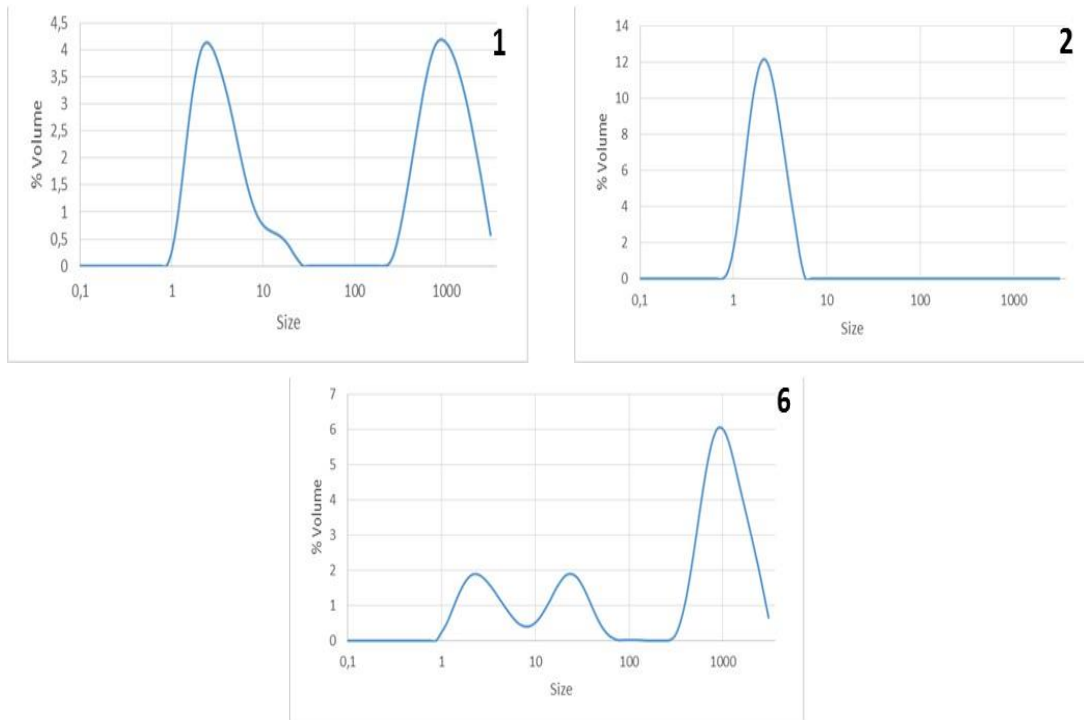


Figura 17: Distribuição de tamanho de partícula em volume relativos aos pontos 1, 2 e 6 para o sistema (água + azeite + Tween 80).

Tabela 11: Tamanho de partícula médio em volume dos pontos 1, 2 e 6 para a formulação (água + azeite + Tween 80) (μm).

	Média		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 6
Dx (10)	2,02	1,42	2,8
Dx (50)	362	2,34	712
Dx (90)	1730	3,95	1870

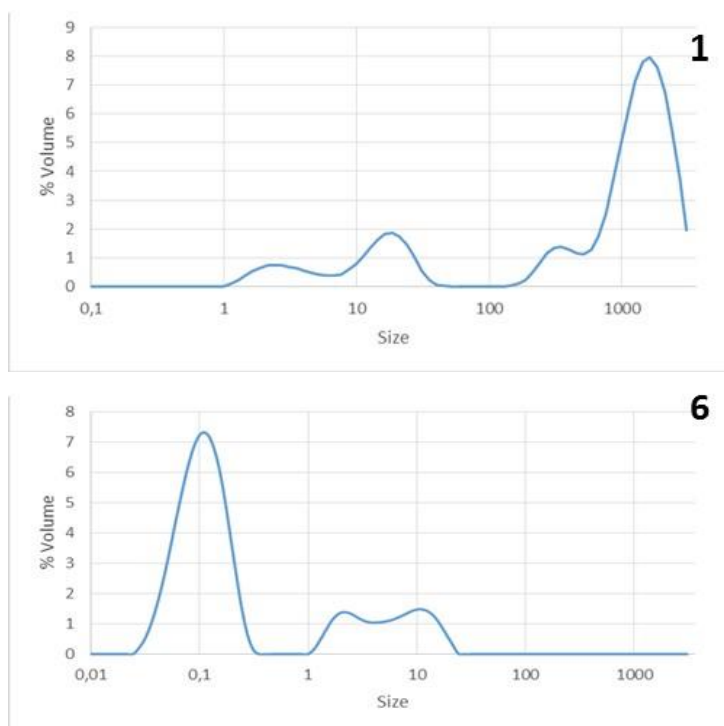


Figura 18: Distribuição de tamanho de partícula em volume relativos aos pontos 1 e 6 para o sistema (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)).

Tabela 12: Tamanho de partícula médio em volume dos pontos 1 e 6 para a formulação (água + azeite + Tween 80/Glicerina (4%)) (μm).

	Média	
	Ponto 1	Ponto 6
D_x (10)	12	0,0612
D_x (50)	1220	0,138
D_x (90)	2450	7,86

4.4. Considerações finais sobre o efeito do co-tensioativo e da temperatura

Alguns agentes tensioativos necessitam da presença de outros agentes de superfície ativos, chamados co-tensioativos, para gerar MEs. Estes compostos pertencem ao grupo

de componentes capazes de formar ligações de hidrogénio e/ou demonstrarem uma forte afinidade para com o tensioativo. Normalmente são utilizados álcoois solúveis em água (Prieto *et al.*, 2013).

No presente trabalho, foram testadas várias misturas pseudoternárias diferentes contendo uma fase aquosa (água pura), uma fase lipofílica (azeite refinado), um tensioativo (Tween 80) e um co-tensioativo (etanol, glicerina, 1-butanol, 2-propanol, Transcutol CG e Span 80). O 1-butanol é, normalmente, usado como um aditivo e o etanol foi testado porque é menos tóxico para aplicações cosméticas.

A penetração do álcool na película interfacial reduz a repulsão das cadeias hidrofóbicas longas do agente tensioativo na interface, favorecendo a sua dissolução na fase lipofílica. A presença do álcool também afeta as propriedades físicas da água. O álcool provoca o aumento do carácter lipofílico do Tween 80 e, adicionalmente, provoca uma diminuição na viscosidade da mistura. No entanto, a presença de álcool na mistura também promove uma diminuição do ponto de turvação do tensioativo (Prieto *et al.*, 2013).

As composições de água pura, da fase lipofílica, do tensioativo e do co-tensioativo foram baseadas tendo em conta o trabalho de Santos (2015) e Prieto *et al.* (2013), onde se fez o estudo de vários co-tensioativos na formação de MEs. A presença do álcool na composição do sistema tensioativo + co-tensioativo foi modificada visando obter sistemas transparentes e de uma única fase (ME). Contudo, a escolha destes volumes deve ser feita de modo a que a amostra não seja muito diluída. Para alguns co-tensioativos, a transparência só é obtida a partir de volumes relativamente grandes destes o que provoca uma diluição acentuada da amostra na ME.

O efeito da temperatura depende do tipo de agente tensioativo, atuando através da modificação da interface e/ou a solubilidade mútua das fases. Os tensioativos não-iónicos, como o Tween 80, são conhecidos por mostrar um comportamento dependente da temperatura (Prieto *et al.*, 2013).

No diagrama de fases ternário para o sistema (água + azeite + Tween 80) verificou-se que o aumento desde a temperatura ambiente (25°C) para 40°C, resultou numa diminuição da região de ‘gel’ como resultado de uma redução da viscosidade. Quanto à região de ‘ME’, esta também diminuiu (tal não era esperado). Quando a temperatura foi aumentada para 60°C e 80°C a região ‘gel’ desapareceu completamente, devido a uma

redução de viscosidade ainda maior com o aumento da temperatura, e a região de ‘ME’ manteve-se igual à observada para a temperatura de 40°C.

No diagrama de fases pseudoternário para o sistema (água + azeite + Tween 80/Span 80) com razão tensioativo/co-tensioativo (1:1), verificou-se que o aumento desde a temperatura ambiente (25°C) para 40°C, não alterou a região de ‘gel’ nem a região de ‘ME’. Quando a temperatura foi aumentada para 60°C e 80°C a região ‘gel’ desapareceu completamente, devido a uma redução de viscosidade ainda maior com o aumento da temperatura, a região de ‘ME’ manteve-se igual à observada para a temperatura de 40°C, a região ‘3 fases’ aumentou significativamente e a região ‘emulsão’ “apareceu” a 80°C.

Foi feita uma comparação dos resultados produzidos com o objetivo de levar a cabo uma seleção fácil das condições operacionais. Obteram-se apenas duas ou três amostras de ME, às quais foi necessário adicionar cerca de 70% ou 80% de tensioativo.

Para o sistema estudado, a melhor combinação para a obtenção de MEs depende das temperaturas permitidas para o processo e produto. À temperatura ambiente o mais aconselhável seria o sistema (água + azeite + Tween 80).

5. Conclusões

As MEs têm sido usadas, desde há muito tempo, como veículo de preparações para aplicação na pele. Estas apresentam boa estabilidade no que diz respeito à separação ou agregação das partículas, são fáceis de preparar e o seu custo de preparação é baixo. Podem ser usadas como veículo de substâncias tanto hidrofílicas como lipofílicas.

Apesar das MEs serem simples de preparar, elas não devem ser vistas como um sistema pouco sofisticado. A escolha e a quantidade de tensioativo/co-tensioativo, fase lipofílica e água afetam significativamente a formação das MEs, a capacidade de solubilização, a carga e a estrutura interna.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de MEs e sua caracterização. Para tal foi utilizado o método da sonicação, dado que é um método simples, rápido e económico, o método da titulação e o método da preparação das misturas individuais.

A utilização do método da titulação, referido frequentemente na literatura para a preparação dos diagramas de fases, revelou-se menos prático que o método designado por

“preparação das misturas individuais”. Este exige a adição de grandes quantidades de água para percorrer uma linha de diluição sendo difícil alcançar composições ricas em água (acima dos 85-90%). Este método é também mais demorado que o método da “preparação das misturas individuais”, onde os pontos de composição selecionada são preparados e analisados simultaneamente.

Para o sistema base selecionou-se azeite refinado (fase lipofílica) e a água ultrapura (fase aquosa). Como tensioativo escolheu-se o Tween 80, tendo o respetivo diagrama de fases construído mostrando a ocorrência de zonas de composição onde se obteve um sistema homogéneo (sistema de uma fase). A análise destes pontos revelou um tamanho de partícula superior ao estipulado para se considerar a formação de MEs (1 e 200 nm).

Face ao resultado anterior, numa segunda fase, escolheu-se um conjunto de co-tensioativos visando facilitar a obtenção de MEs. De uma forma geral, os resultados obtidos não foram muito incrementados, tendo-se, numa terceira fase, optado por fazer um estudo para diferentes temperaturas. Tendo em conta a influência da termodinâmica sobre o sistema coloidal, a solubilidade do tensioativo na fase lipofílica pode ser aumentada por um aumento de temperatura o que pode favorecer a expansão da área de ME (Prieto *et al.*, 2013). Este último estudo só foi efetuado para os sistemas: Água + azeite + Tween 80 e Água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1).

Em síntese, este trabalho permitiu adquirir conhecimentos sobre a preparação de MEs e preparação dos diagramas de fases ternários/pseudoternários. Foi ainda possível observar que, para o sistema estudado, foi possível obter pontos de composição onde só era formada uma fase. Dos co-tensioativos testados, o que originou melhores resultados foi o Span 80 à temperatura ambiente. Neste trabalho, a elevada viscosidade do azeite refinado pode ter dificultado a formação de MEs, tal como relatado na literatura.

Como perspetivas futuras, fazer um trabalho mais completo quanto à caracterização do tamanho de partícula, sendo que para o efeito será necessário preparar quantidades superiores de amostra. Adicionalmente poderão ser testadas outras fases lipofílicas de interesse para a área da cosmética.

6. Referências bibliográficas

1. Almeida, L.F., “Um Analisador Fluxo-Batelada com Bomba-Pistão Aplicado à Preparação de Soluções de Calibração e Microemulsões: Determinação de Metais em Água Mineral e Gasolina por GF AAS”, Tese de Doutorado, UFPE, Recife, Brasil, 2007.
2. Almeida, M.E., Teixeira, H.F. & Koester, L.S., “Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade”, *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 780-8, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.
3. Battisti, M.A., “Desenvolvimento de nanocarreador lipídico contendo extrato padronizado de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul visando à obtenção de medicamento de uso tópico”, Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2015.
4. Bedin, A.C., “Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação *in vitro*”, Tese de Mestrado, UFSC-CCS, Toledo, 2011.
5. Carvalho, A., Egídio, C.M., Nakaya, H., Salotti, J., Fontanari, J.C., Cardozo, K.H.M., Sakabe, N.J., Asprino, P.F. & Torres, B.B., “Bioquímica da Beleza”, Curso de verão, São Paulo, Brasil, 2005.
6. Castro, R.M.L., “Emulsão: uma revisão bibliográfica”, UFP-CCS, Brasil, 2014.
7. Damasceno, B.P.G.L., Silva, J.A., Oliveira, E.E., Silveira, W.L.L., Araújo, I.B., Oliveira, A.G. & Egito, E.S.T., “Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32, 9-18, 2011.
8. Derle, D.V., Sagar, B.S.H. & Pimpale, R., “*Microemulsion as a Vehicle for Transdermal Permeation of Nimesulide*”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 622-625, 2006.
9. Estephan, E.C., “Microemulsão do sistema água-etanol-isooctano”, Tese de Mestrado, U.F.R.J.-E.Q., Rio de Janeiro, Brasil, 2012.
10. Fanun, M., “*Microemulsions: Properties and Applications*”, *Surfactant science series, Surfactant science*, 144, 2009.

11. Figueiredo, K.A., Mendes, R.M.B., Carvalho, A.L.M., & Freitas, R.M., “Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos para a via transdérmica: uma prospecção tecnológica”, *Revista GEINTEC*, 3, 36-46, 2013.
12. Formariz, T.P., Urban, M.C.C., Júnior, A.A.S., Gremião, M.P.D. & Oliveira, A.G., “Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 3, 2005.
13. Goheland, M.C., & Nagori, S.A., “*Fabrication and Evaluation of Hydrogel Thickened Microemulsion of Ibuprofen for Topical Delivery*”, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 44, 2, India, 2010.
14. González, M.M., “*Production of emulsions with controlled droplet size containing bioactive compounds using membranes*”, Tese de Doutorado, UO-DCEE, Oviedo, Espanha, 2013.
15. Gupta, S. & Moulik, S.P., “*Biocompatible Microemulsions and Their Prospective Uses in Drug Delivery*”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 1, India, 2008.
16. <https://www.anatrace.com/Products/General-Purpose-Laboratory-Detergents/MB-REAGENTS/T1004>.
17. Júnior, A.S.C., Fialho, S.L., Carneiro, L.B. & Oréfica, F., “Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica”, *Arq. Bras. Oftalmol.*, 66, 385-91, 2003.
18. Klein, T., “Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose”, UEP-FCF, Araraquara, Brasil, 2007.
19. Lakshmi, J., Kumar, B.A. & Gupta, S., “*Investigation of Microemulsion as a Potencial Carrier for Advanced Transdermal Delivery: An Overview*”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20, 51-59, 2013.
20. Lawrence, M.J. & Rees, G.D., “*Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 89-121, 2000.
21. Lopes, L.B., “*Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions*”, *Pharmaceutics*, 6, 52-77, 2014.

22. Mehta, D.P., Rathod, H.J. & Shah, D.P., “*Microemulsions: A Potential Novel Drug Delivery System. Department of Pharmaceutics*”, *Acta Scientifica International Journal of Pharmaceutical Science*, 1, 2015.
23. Mendonça, C.R.B., “Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos”, Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2005.
24. Millioli, V.S., “Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo”, Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, Brasil, 2009.
25. Naoui, W., Bolzinger, M.A., Fenet, B., Pelletier, J., Valour, J.P., Kalfat, R. & Chevalier, Y., “*Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug*”, *Pharmaceutical Research*, 28, 1683-1695, 2011.
26. Neves, J.K.O., “Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*)”, Dissertação de Mestrado, UEPB, Campina Grande – PB, Brasil, 2013.
27. Nóbrega, G.A.S., “Remoção da água do gás natural por absorção utilizando sistemas microemulsionados”, Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Natal - RN, Brasil, 2003.
28. Oliveira, A.G., Scarpa, M.V., Correa, M.A., Cera, L.F.R. & Formariz, T.P., “Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos”, *Química Nova*, 27, 1, 2004.
29. Papadimitriou, V., Sotiroudis, T.G. & Xenakis, A., “*Olive Oil Microemulsions: Enzymatic Activities and Structural Characteristics*”, *Institute of Biological Research & Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation*, 23, 4, 2007.
30. Prieto, C. & Calvo, L., “*Performance of the Biocompatible Surfactant Tween 80, for the Formation of Microemulsions Suitable for New Pharmaceutical Processing*”, *Journal of Applied Chemistry*, 2013.
31. Rafeiro, D.F.B., “Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica”, Tese de Mestrado, UL-ECTS, Lisboa, Portugal, 2013.

32. Reis, M.Y. de F.A., “Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico”, CCBS, Campina Grande - PB, Brasil, 2014.
33. Rosani, L., “Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais”, UFSCar, São Paulo, Brasil, 2011.
34. Rossi, C.G.F.T., Dantas, T.N. de C., Neto, A.A.D. & Maciel, M.A.M., “Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial”, Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra, 26, 45-66, 2007.
35. Rukmini, A., Raharjo, S., Hastuti, P. & Supriyadi, S., “*Formulation and stability of water-in-virgin coconut oil microemulsion using ternary food grade nonionic surfactants*”, *International Food Research Journal*, 1, 259-264, 2012.
36. Sainorudin, M.H., Rozaini, M.Z.H., Hamzah, H., Saupi, A.A.M., Norazemi, N.F., Ismail, Z., Ying, J.S.P., Ibrahim, N.H. & Zain, M.H., “*Preliminary Study of Sunscreen and Anti-Tyrosinase Effect on Microemulsion Extract from Melaleuca Cajuputi Essential Oil using Nonionic Surfactant*”, *Journal of Chemical Sciences*, 2,1, 2014.
37. Santos, F.R.A., “Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações”, FCS-UFP, Porto, Portugal, 2011.
38. Santos, P.S. da S., “Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno”, Tese de Mestrado, FF-UP, Porto, Portugal, 2015.
39. Silva, J.A., Apolinário, A.C., Souza, M.S.R., Damasceno, B.P.G.L. & Medeiros, A.C.D., “Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31, 125-131, 2010.
40. Singh, V., Sharma, H., Veerma, R., Javed, A. & Singh, M., “*Topical non steroidal anti inflammatory drug (NSAIDs) microemulsions: Rationale, review and future prospective*”, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2013.
41. Soares, T.P., “Nanocosmética à base de produtos naturais aplicada à Psoríase”, Tese de Mestrado, IPB, Bragança, Portugal, 2013.

42. Stubenrauch, C., “*Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives*”, Wiley, 2009.
43. Syed, H.K. & Peh, K.K., “*Identification of phases of various oil, surfactant/co-surfactants and water system by ternary phase diagram*”, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 71, 301-309, 2014.
44. Toscano, A.M., “*Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais*”, Tese de Mestrado, FF-UC, Coimbra, Portugal, 2013.

7. Anexos

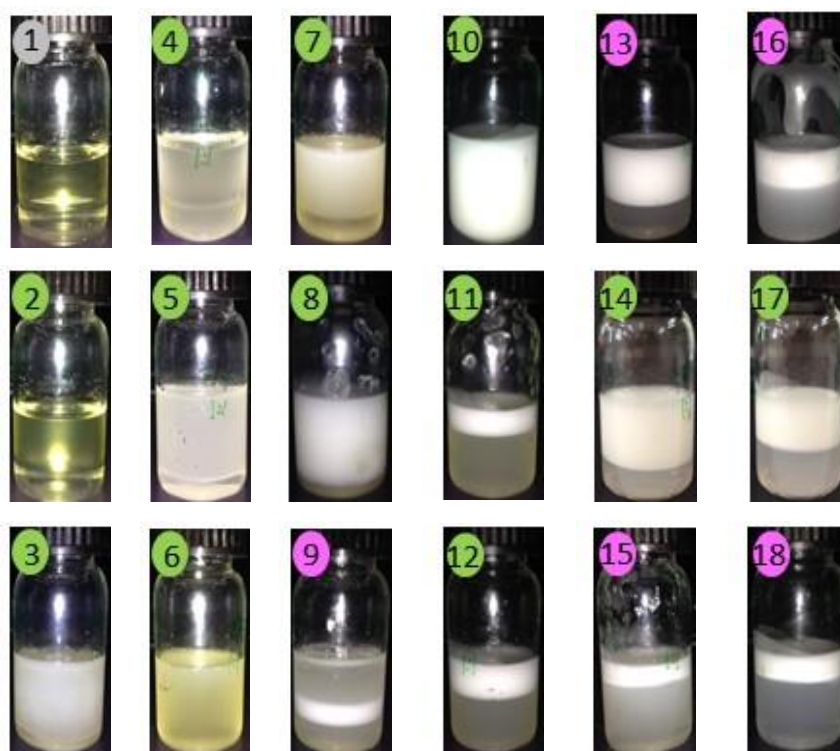
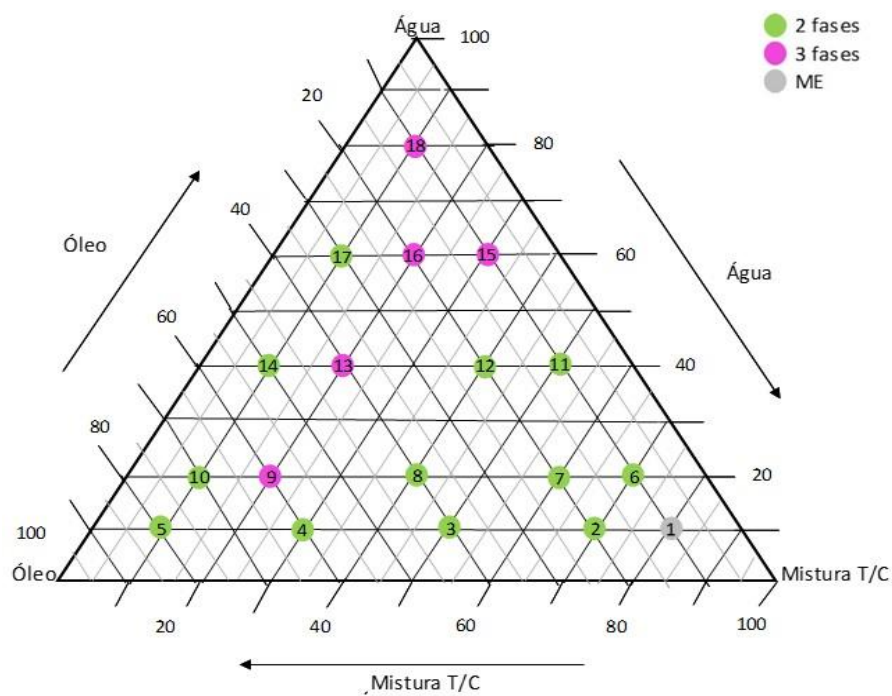


Figura A- 1: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:1)).

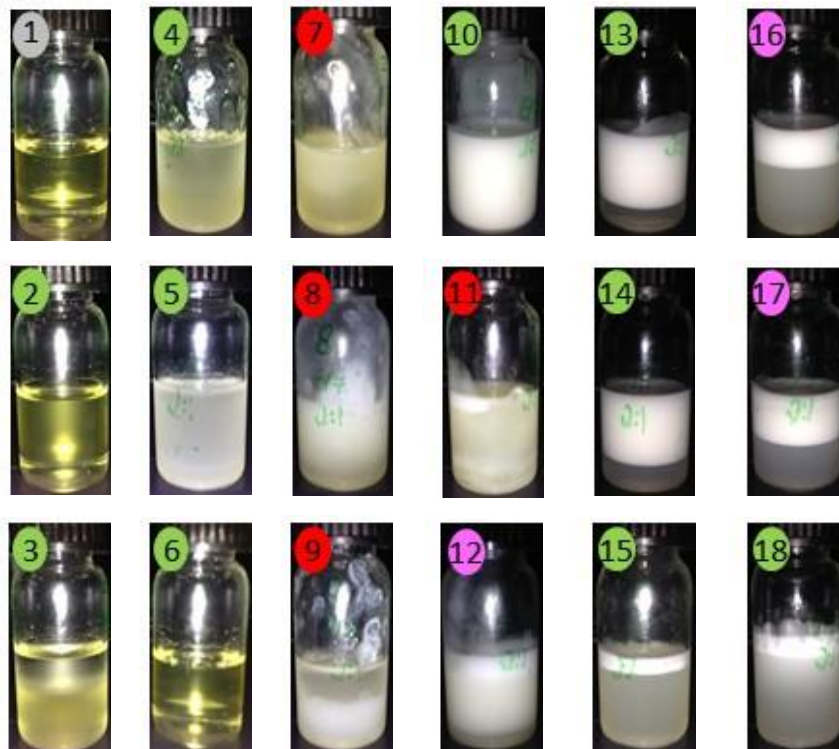
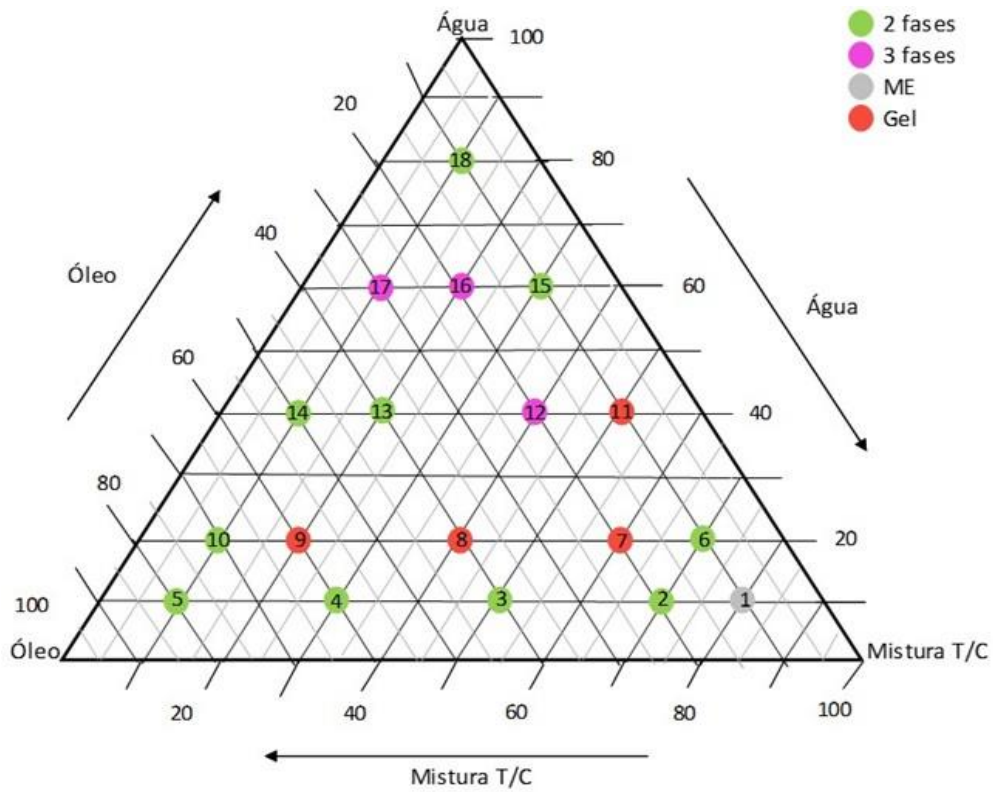


Figura A- 2: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (2:1)).

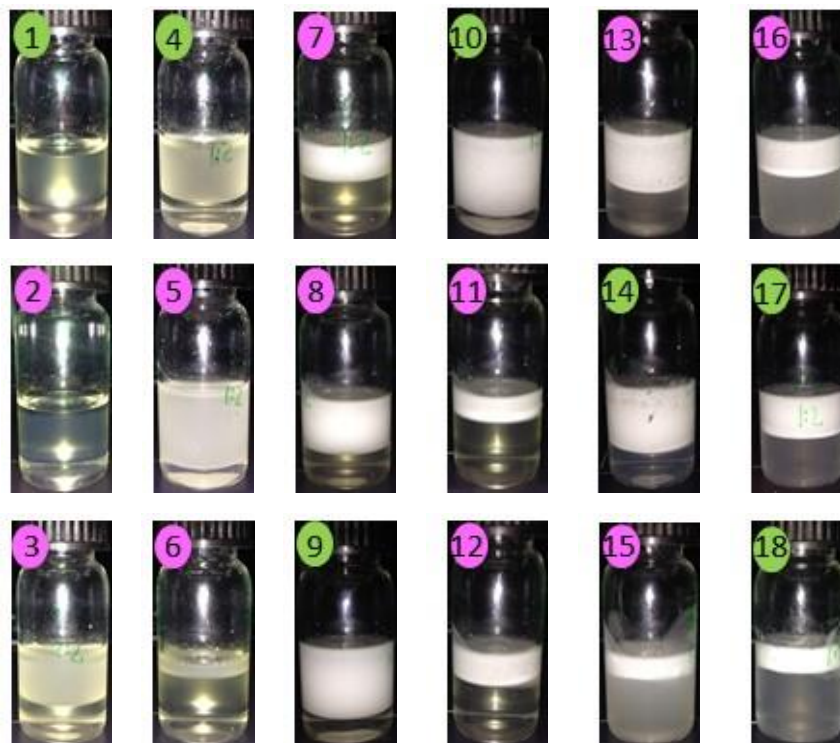
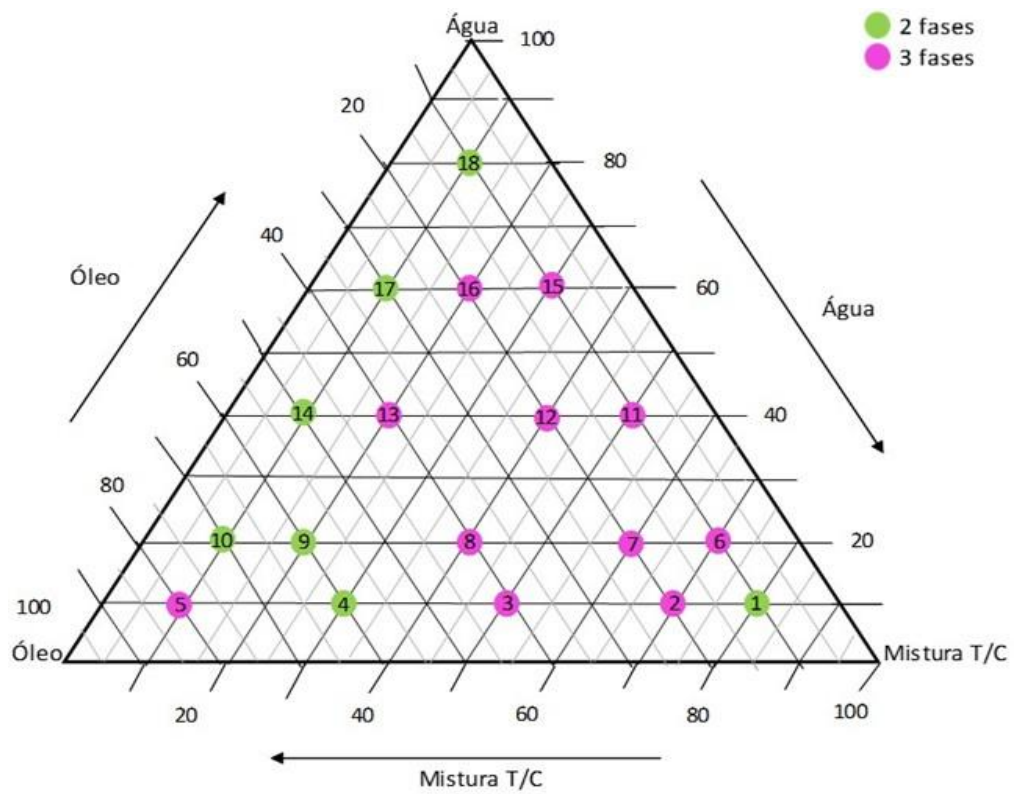


Figura A- 3: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Glicerina (1:2)).

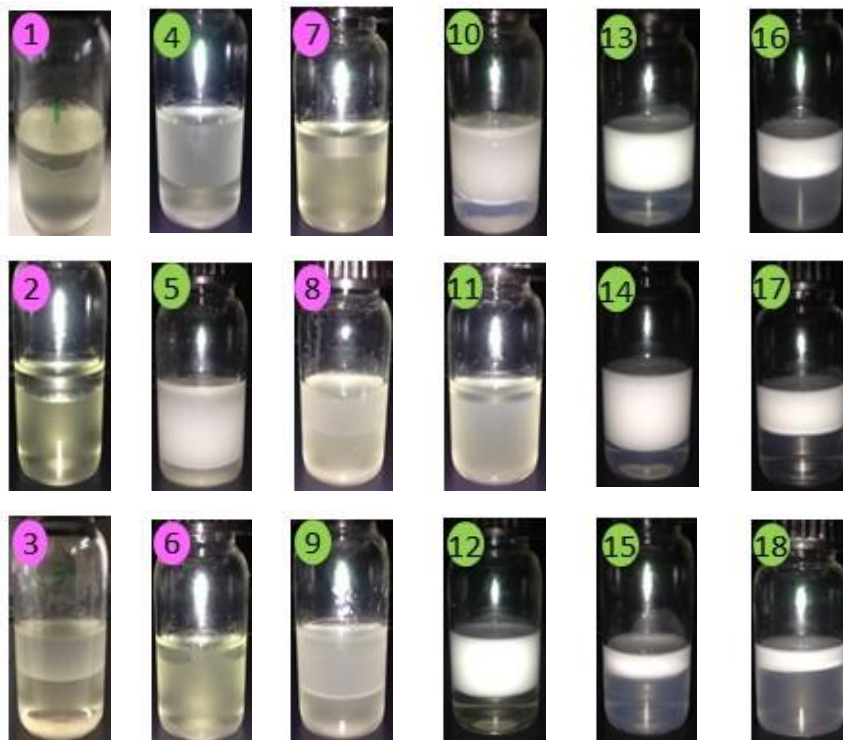
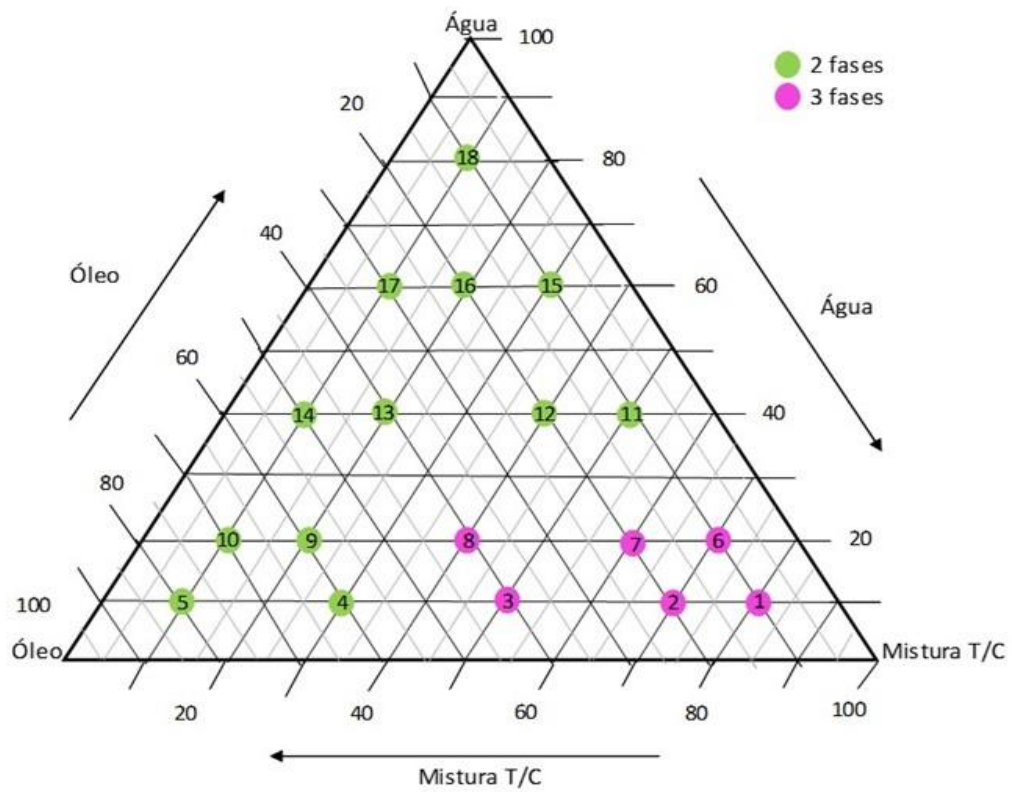


Figura A- 4: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (1:1)).

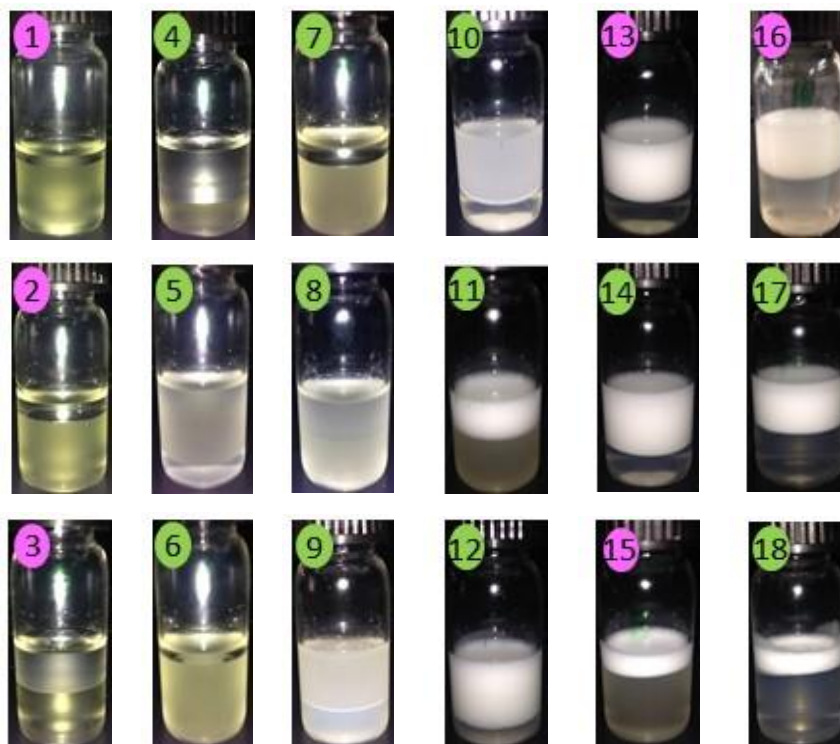
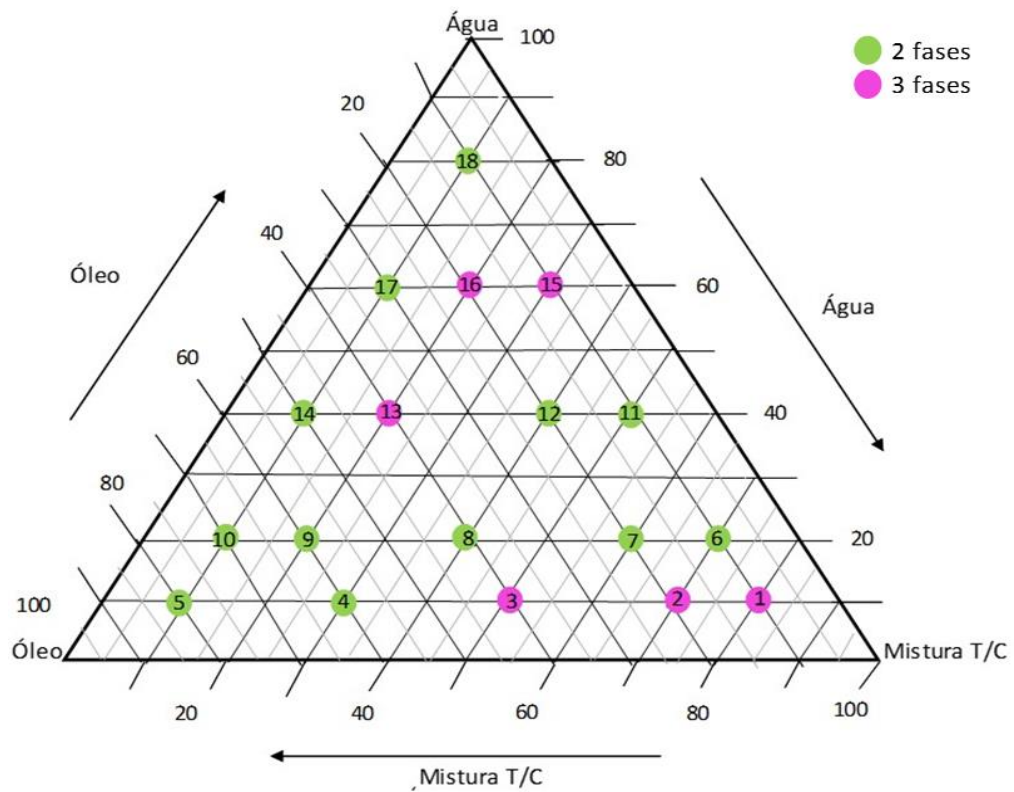


Figura A- 5: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (2:1)).

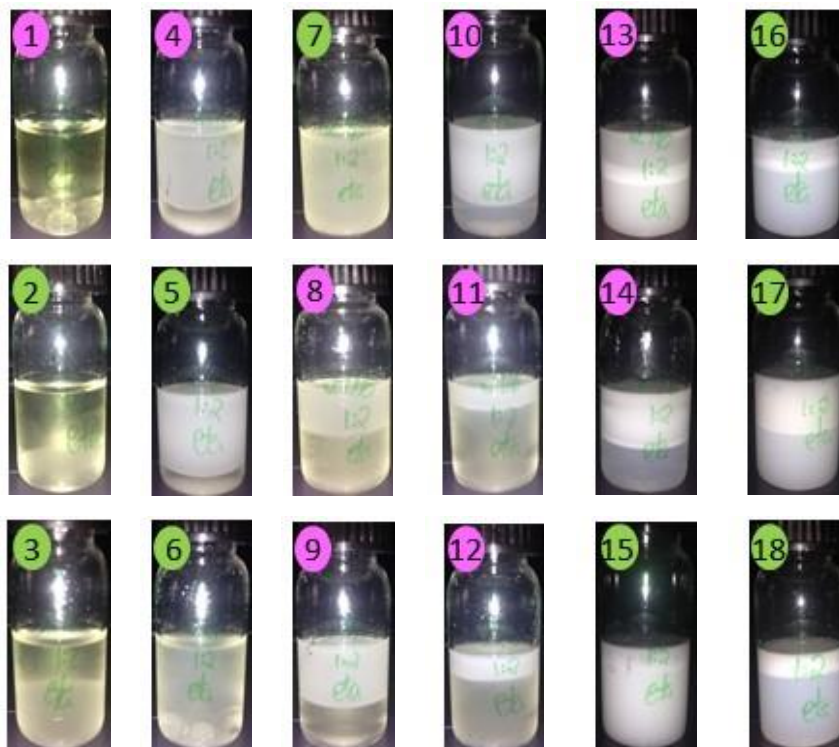
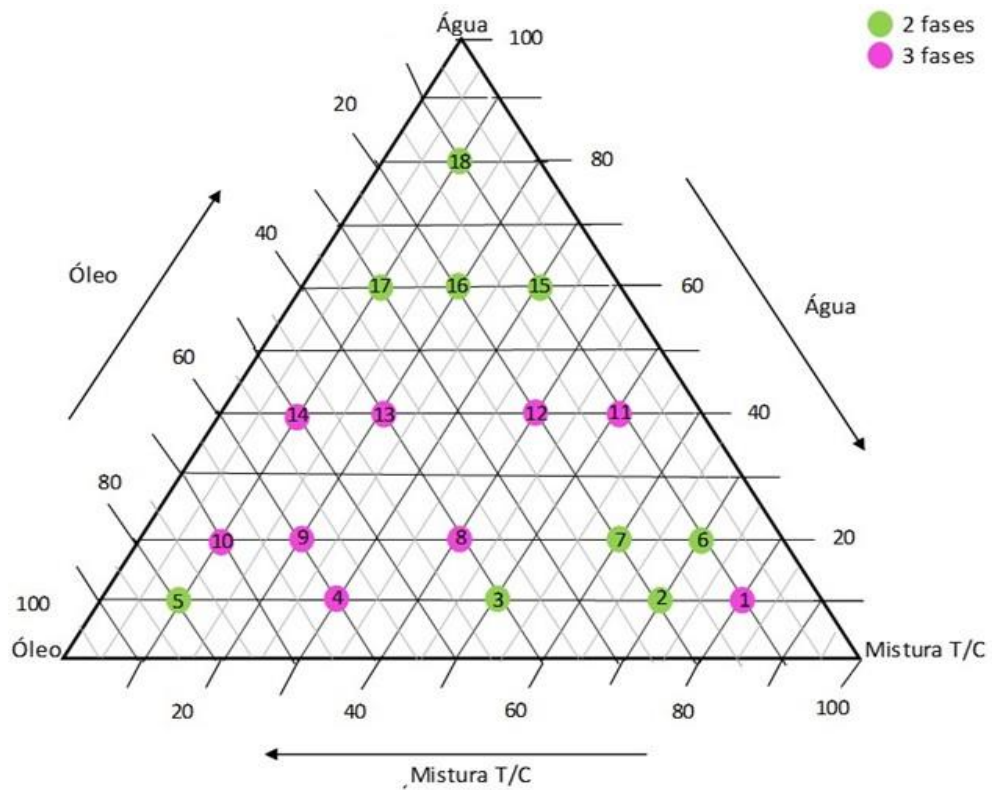


Figura A- 6: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Etanol (1:2)).

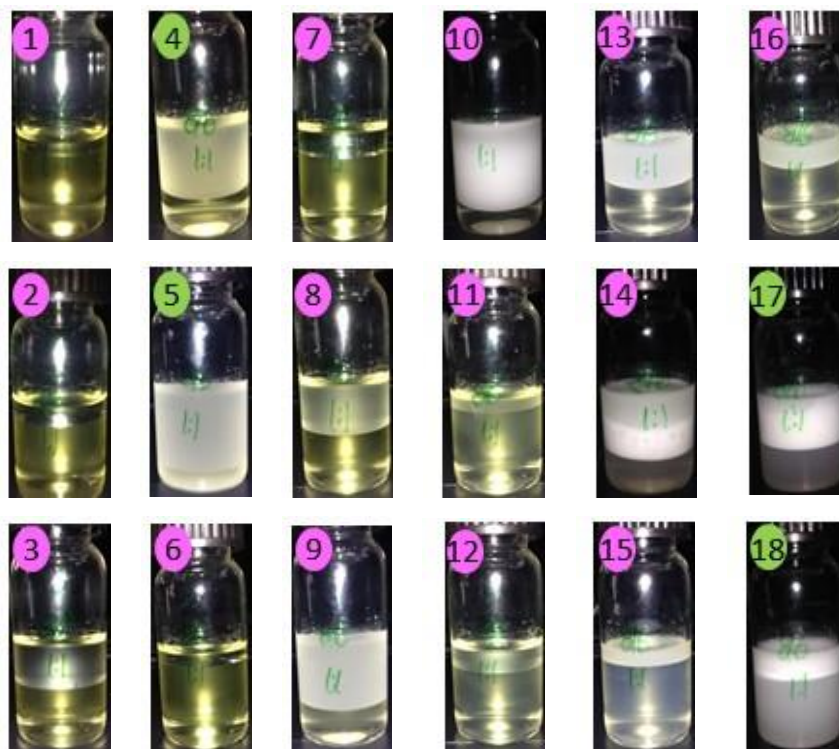
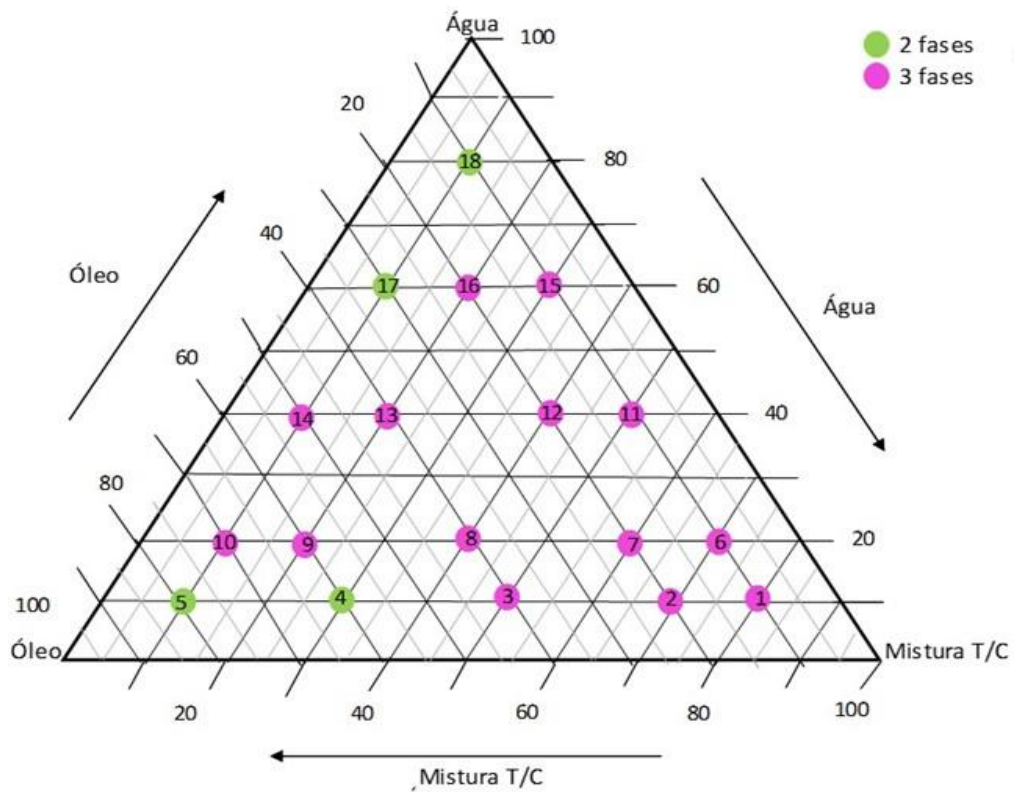


Figura A- 7: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:1)).

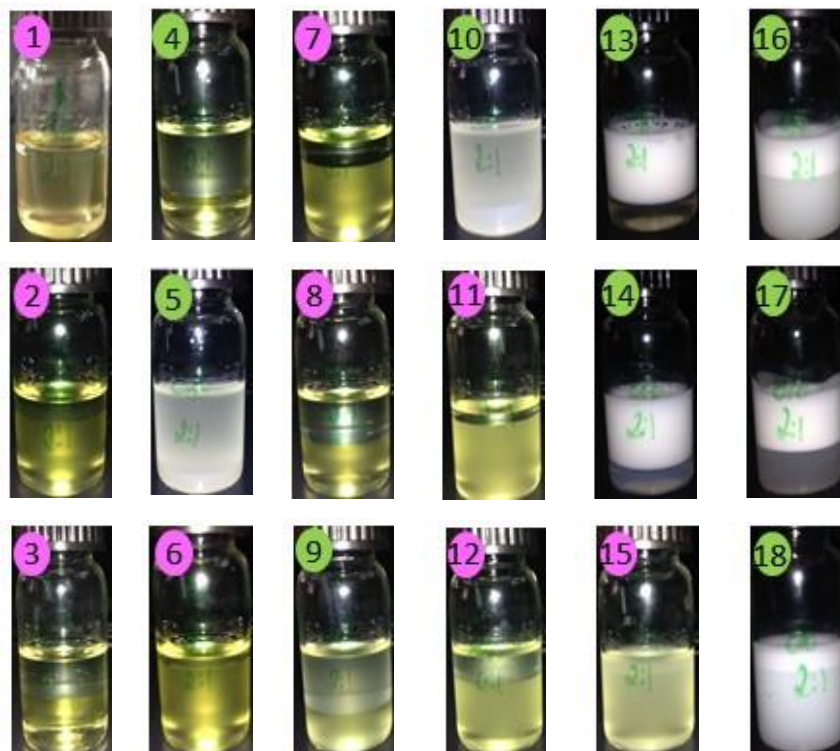
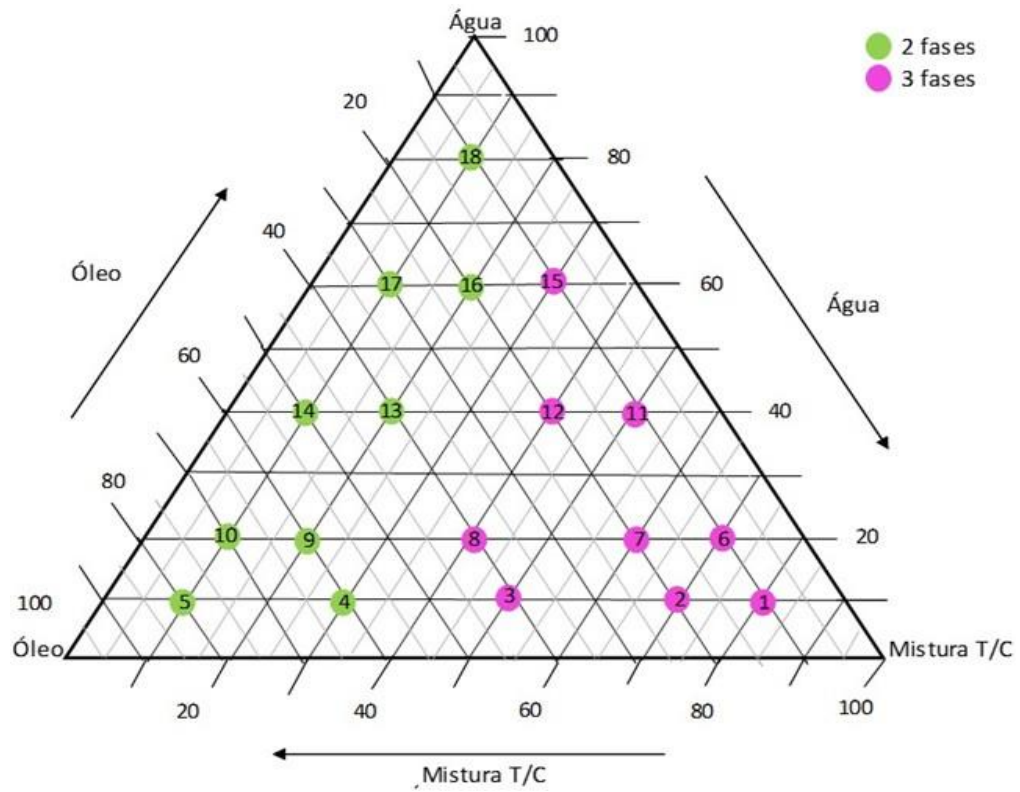


Figura A- 8: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (2:1)).

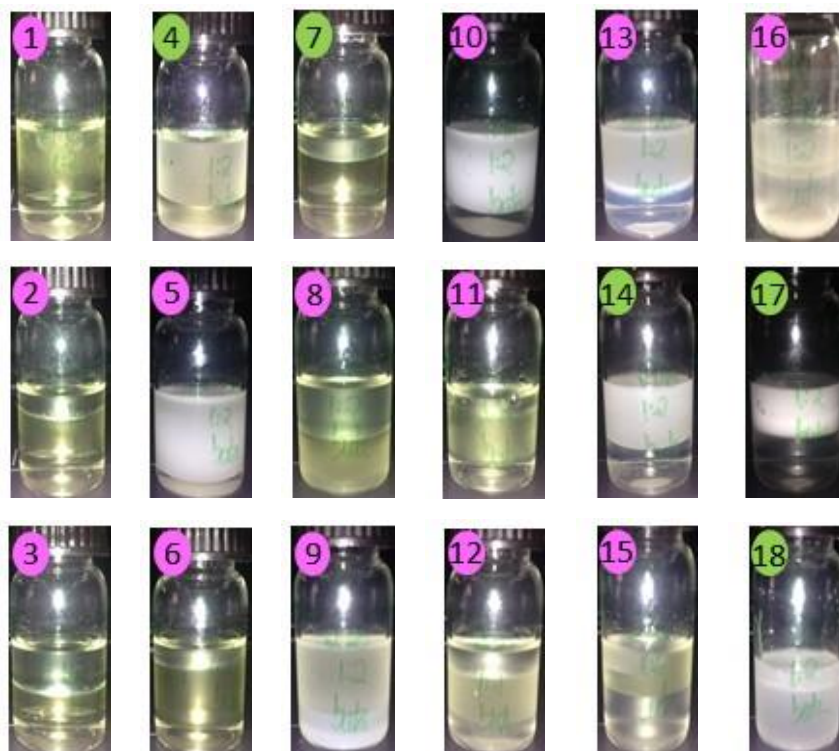
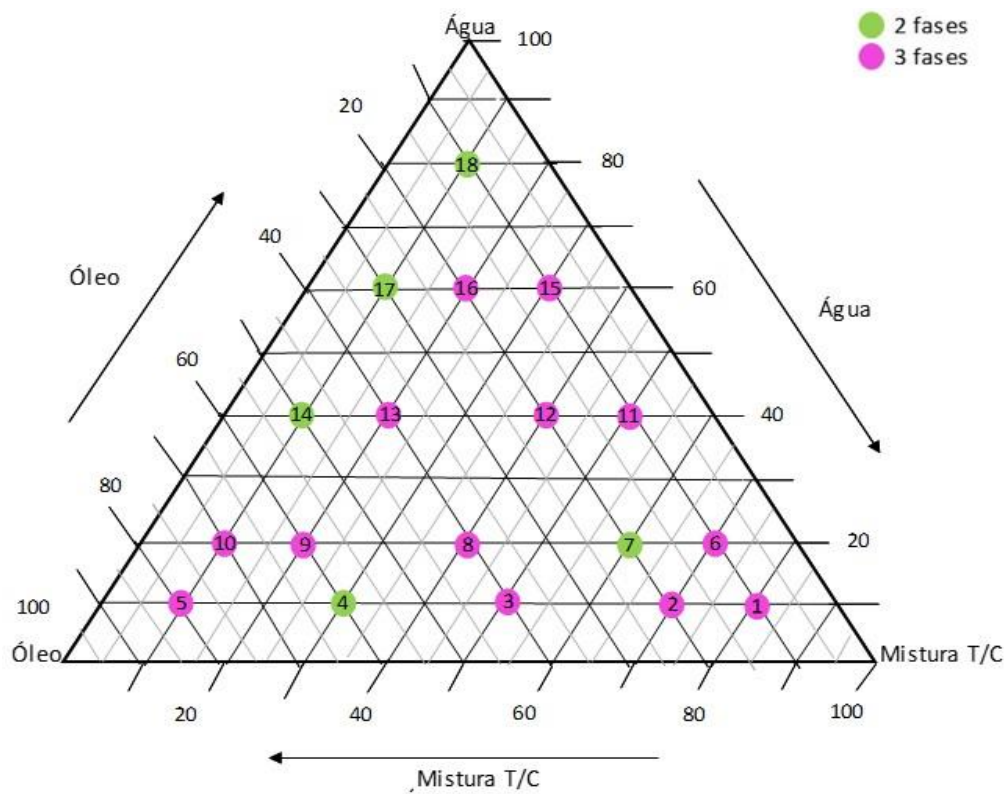


Figura A- 9: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/1-butanol (1:2)).

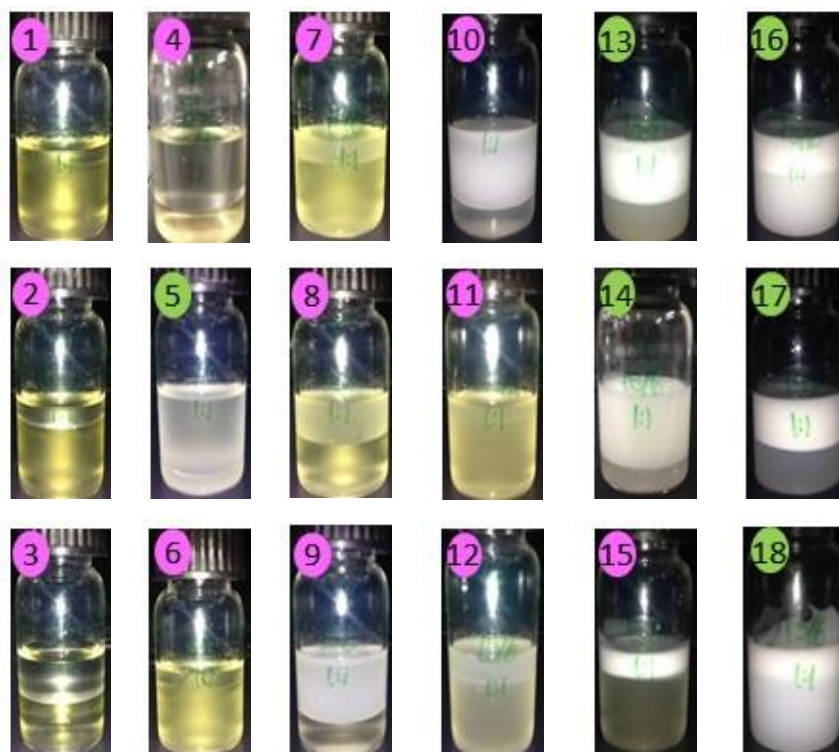
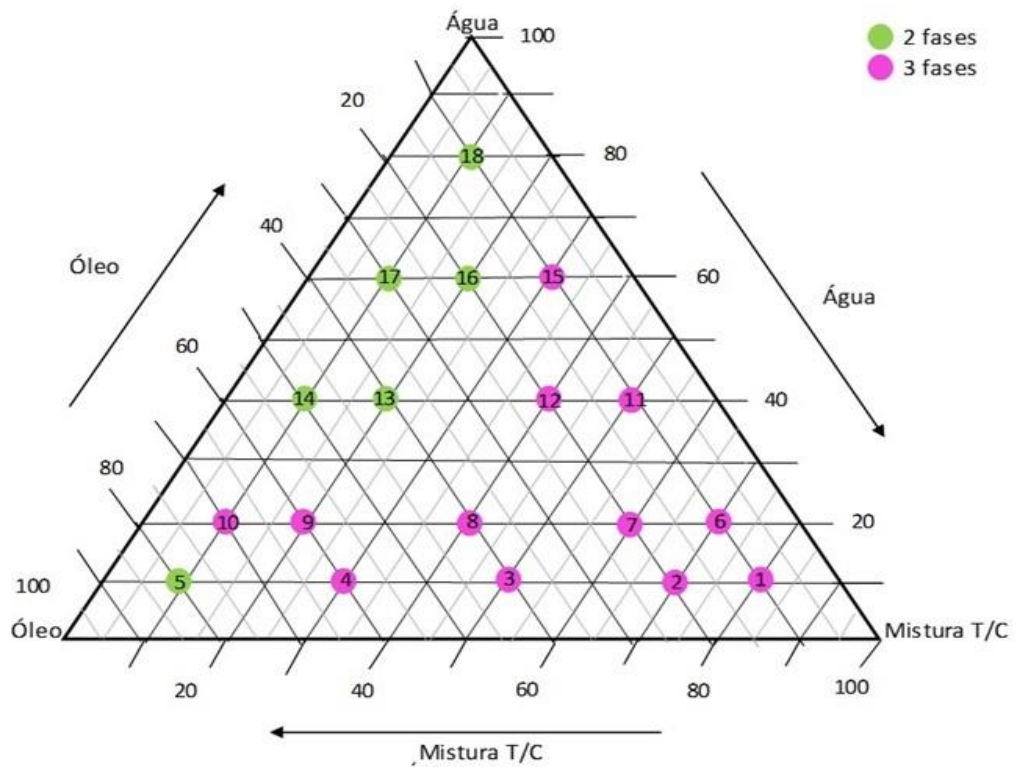


Figura A- 10: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:1)).

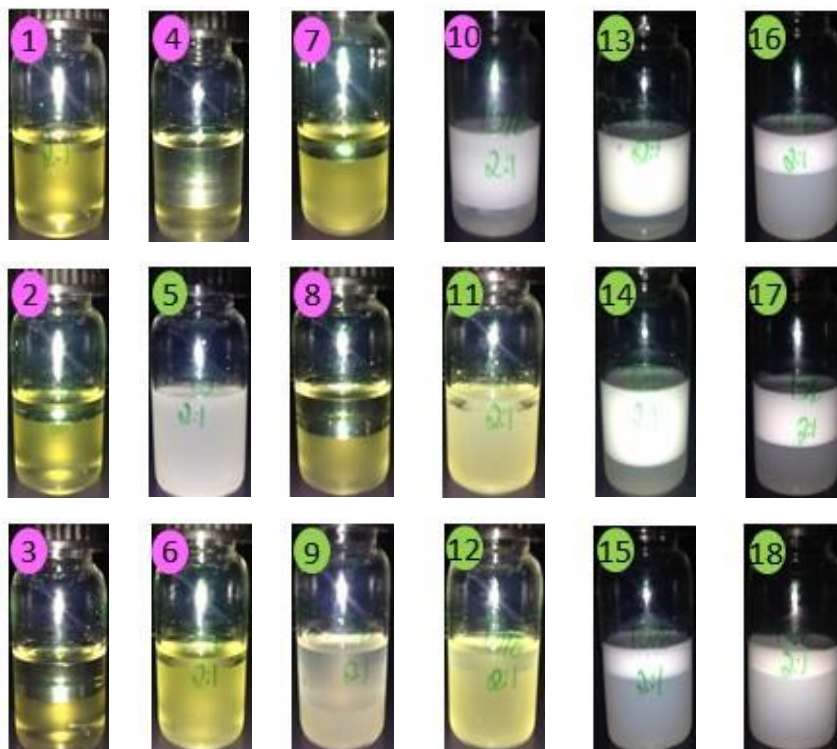
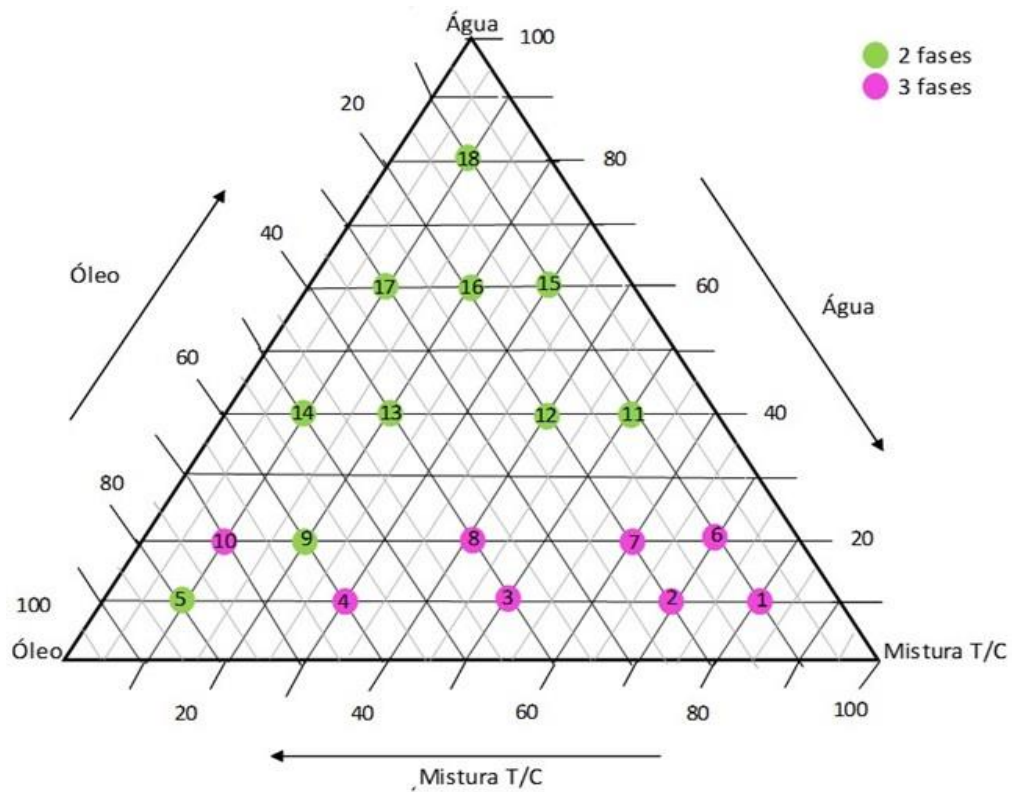


Figura A- 11: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (2:1)).

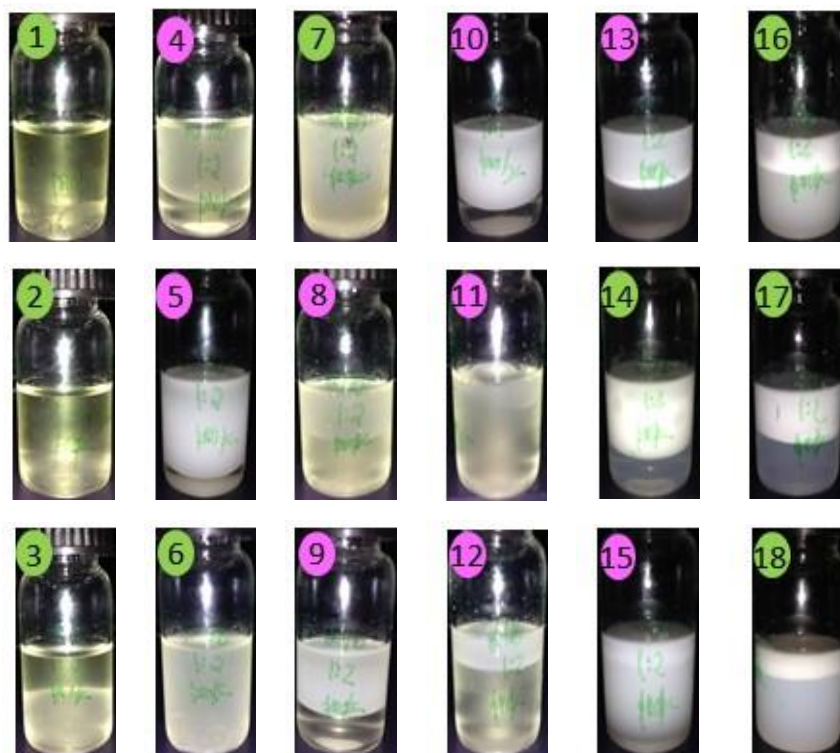
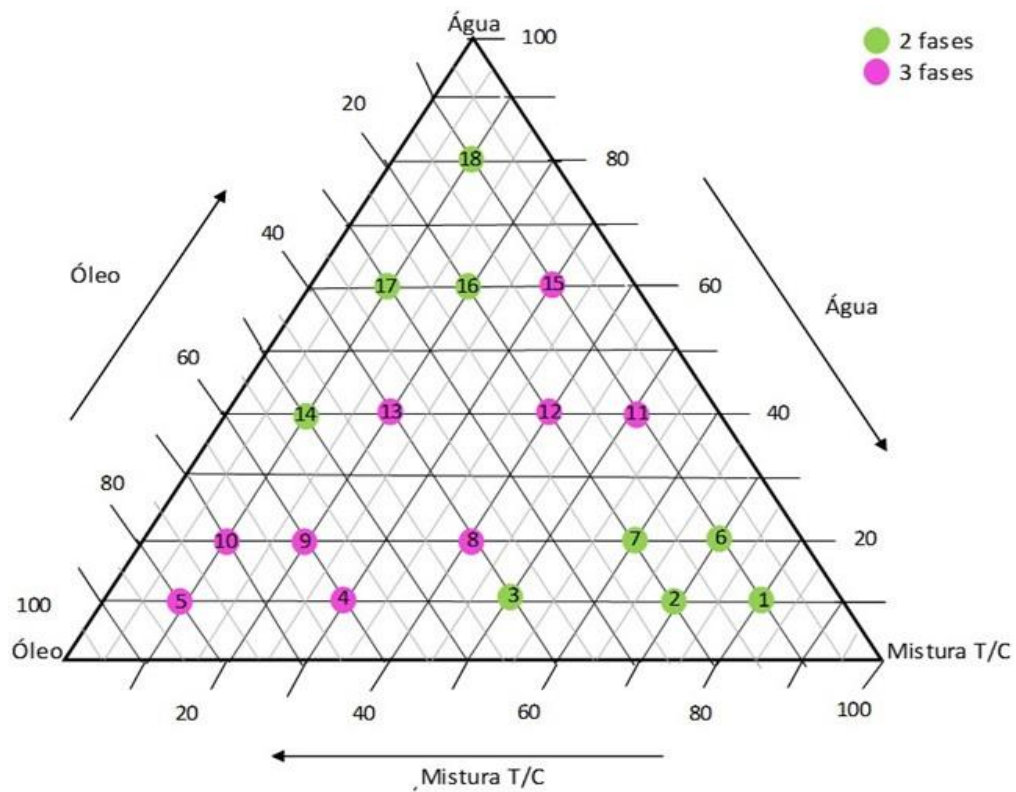


Figura A- 12: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/2-propanol (1:2)).

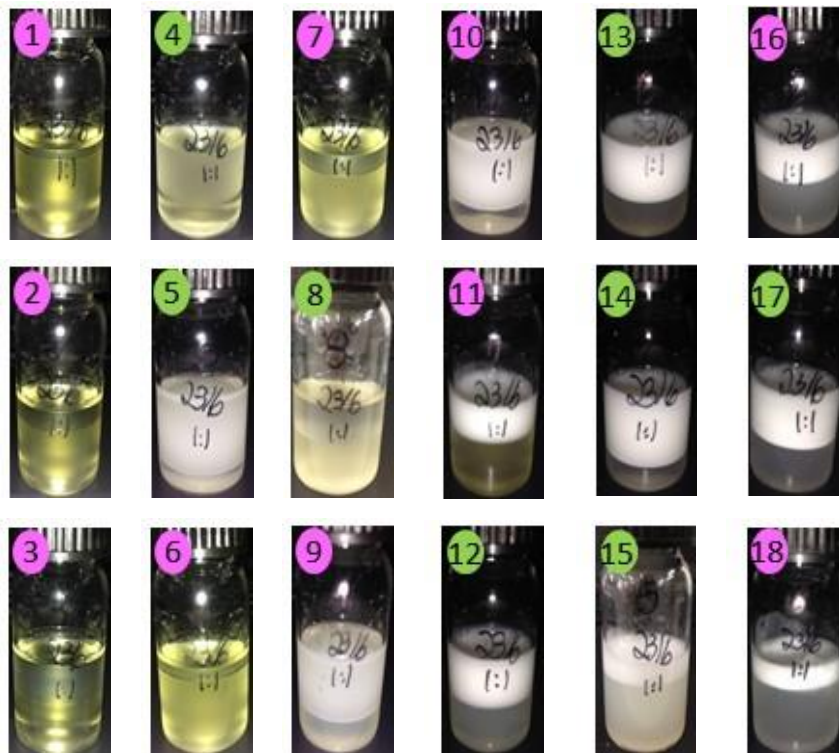
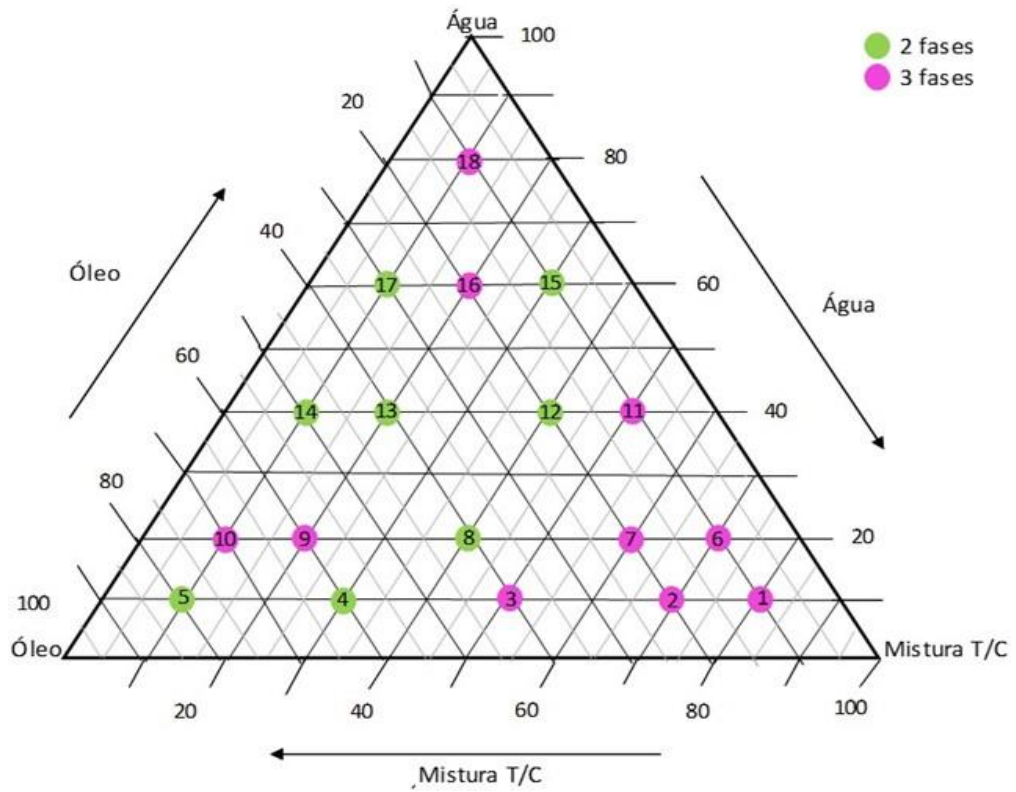


Figura A- 13: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:1)).

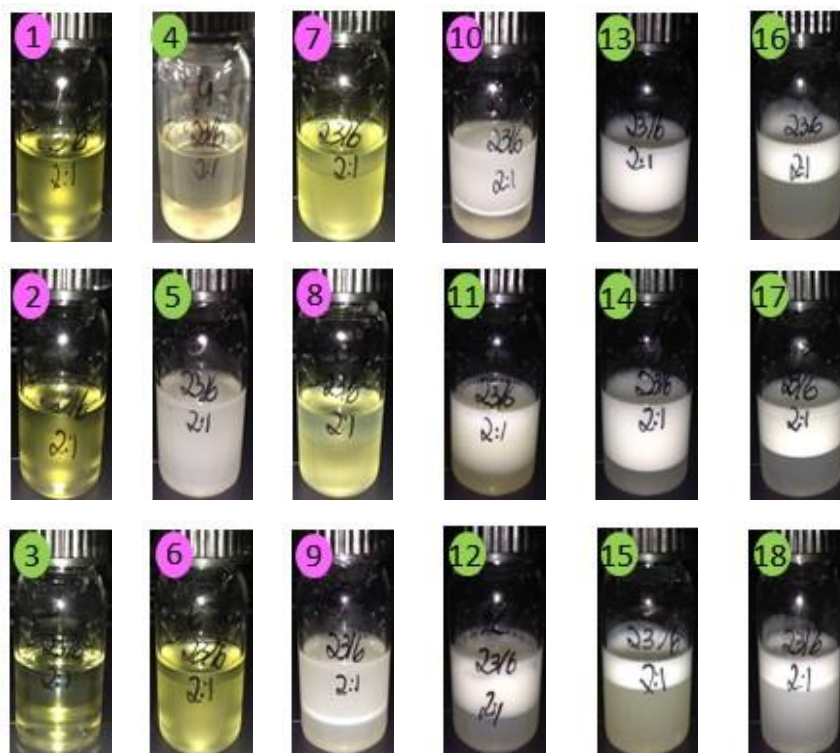
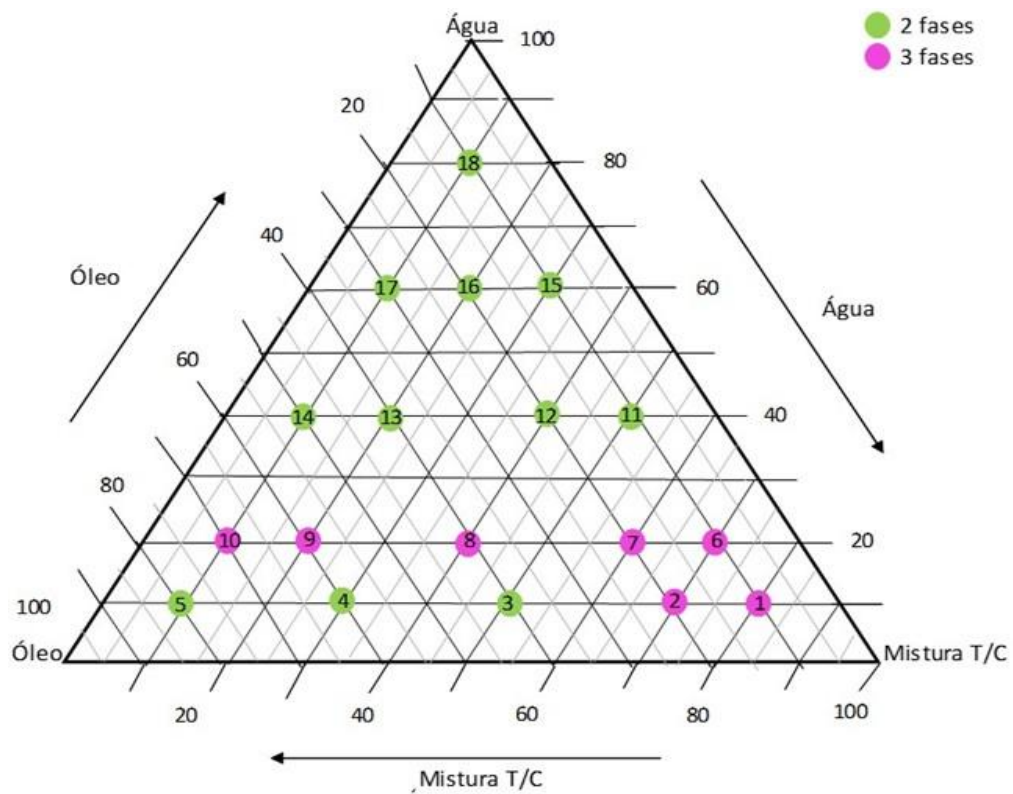


Figura A- 14: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (2:1)).

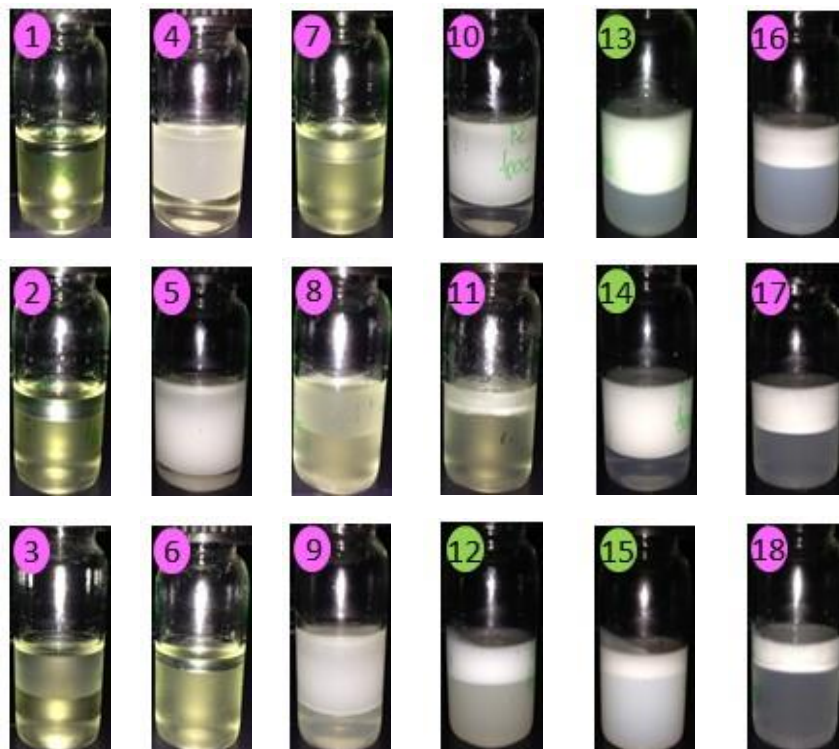
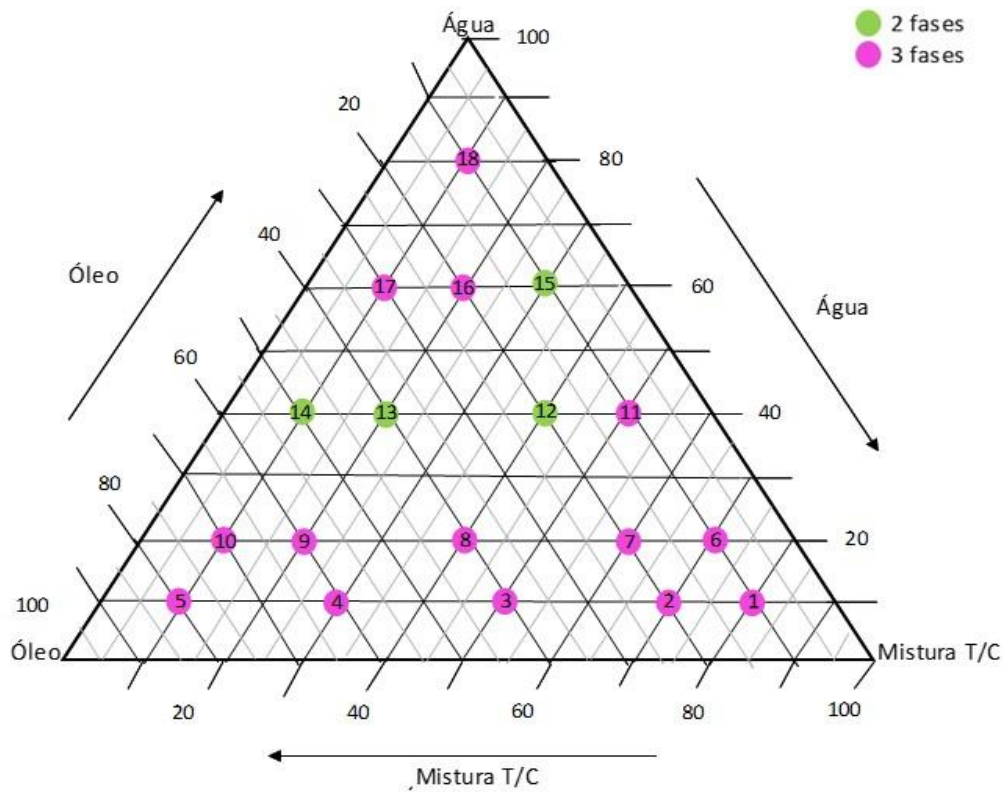


Figura A- 15: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Transcutol CG (1:2)).

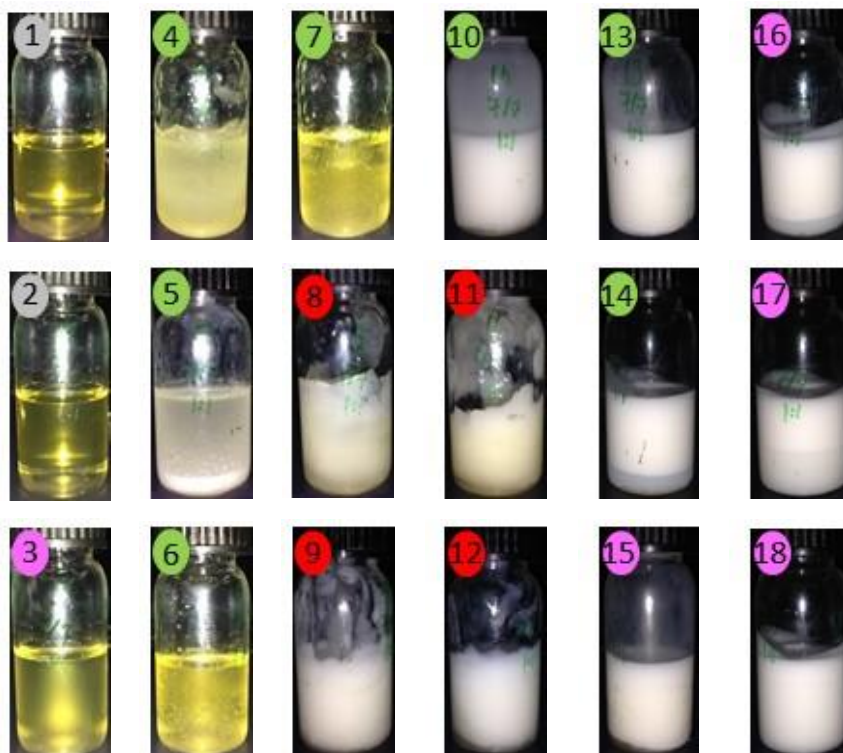
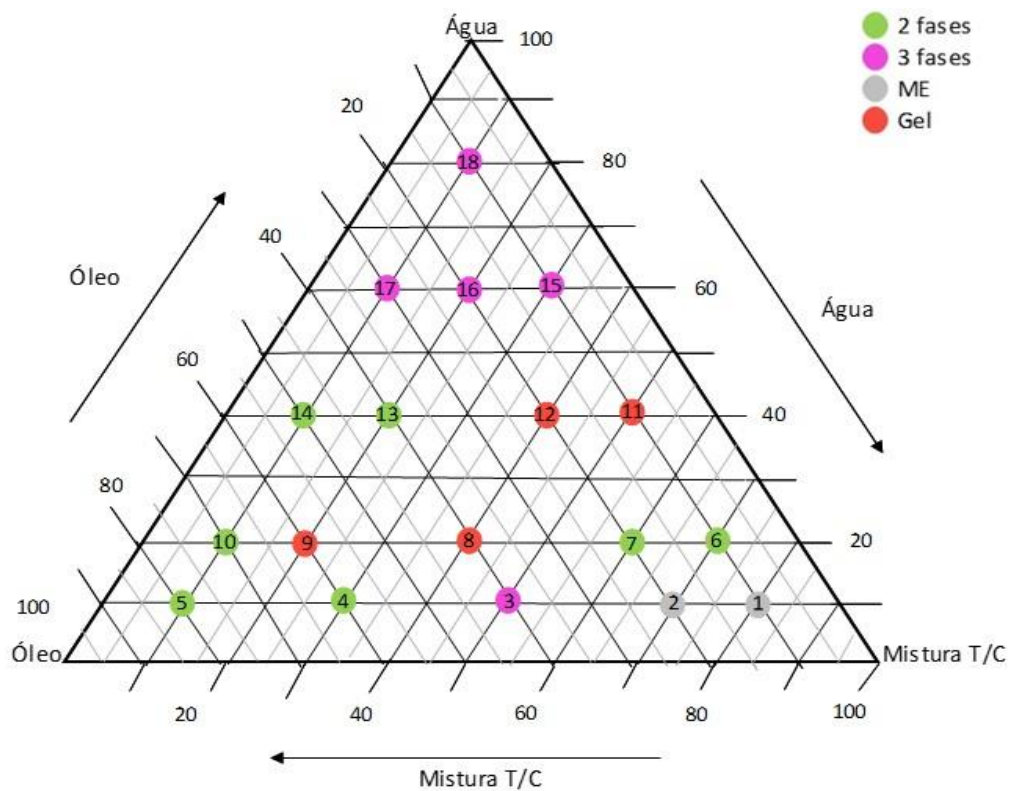


Figura A- 16: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1)).

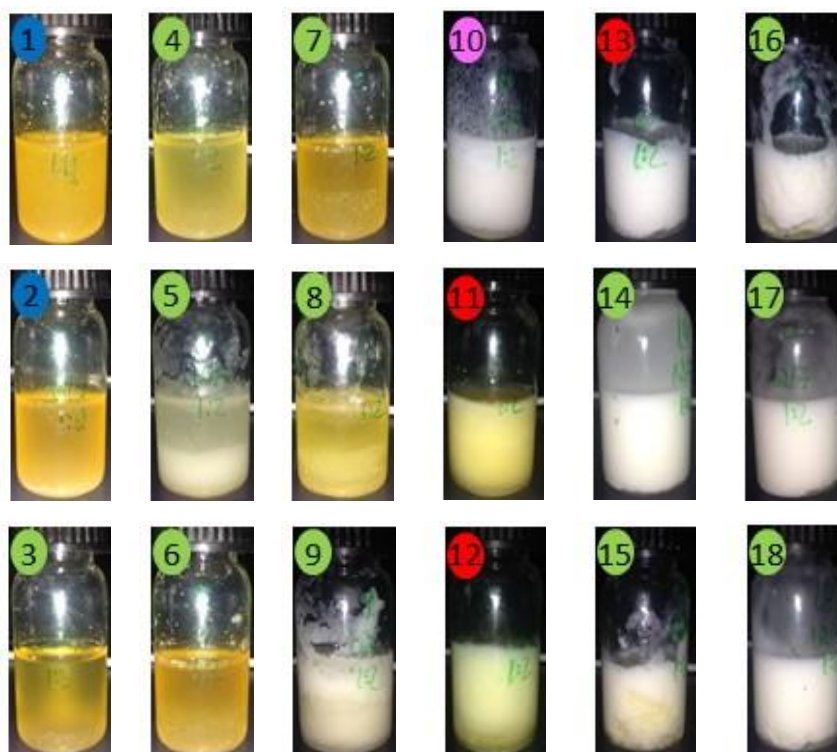
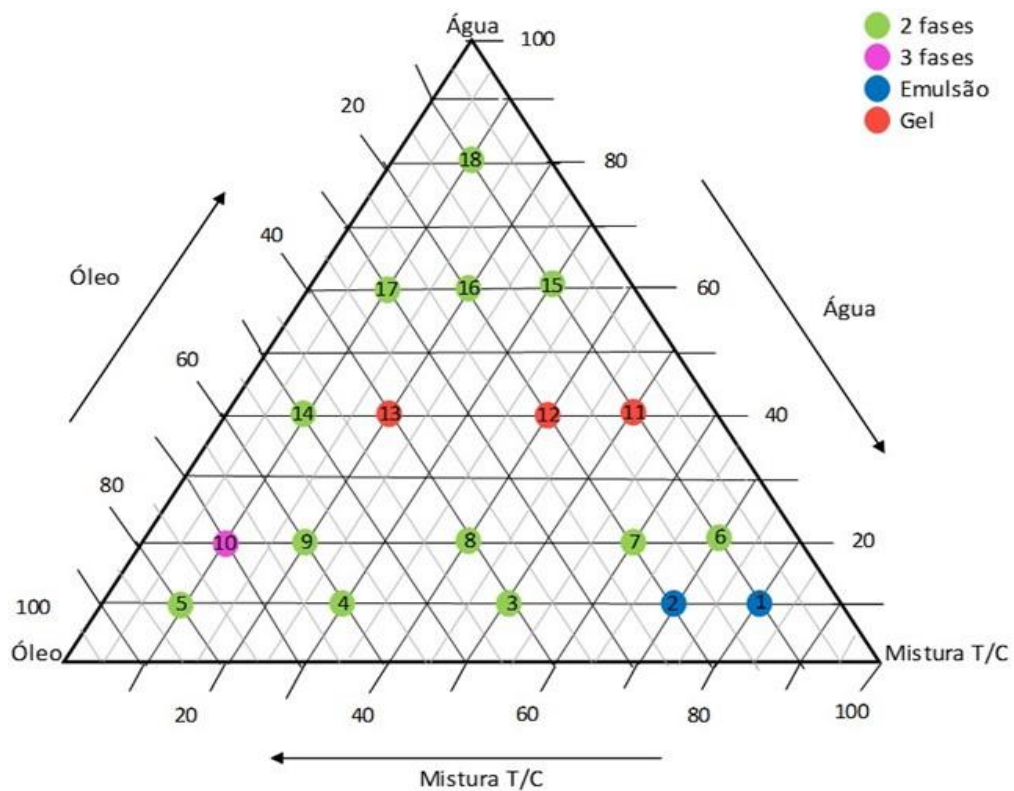


Figura A- 17: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:2)).

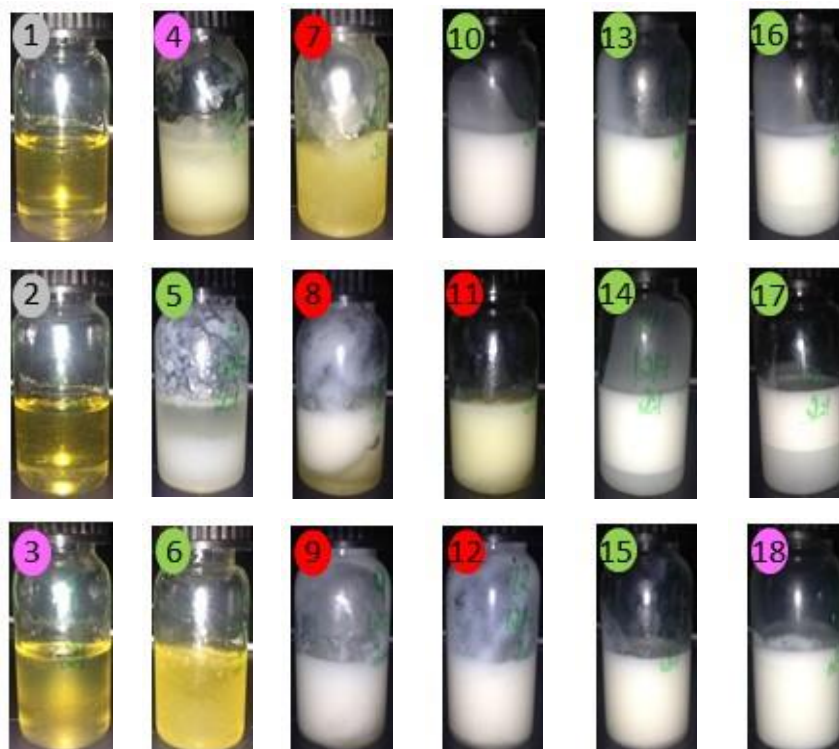
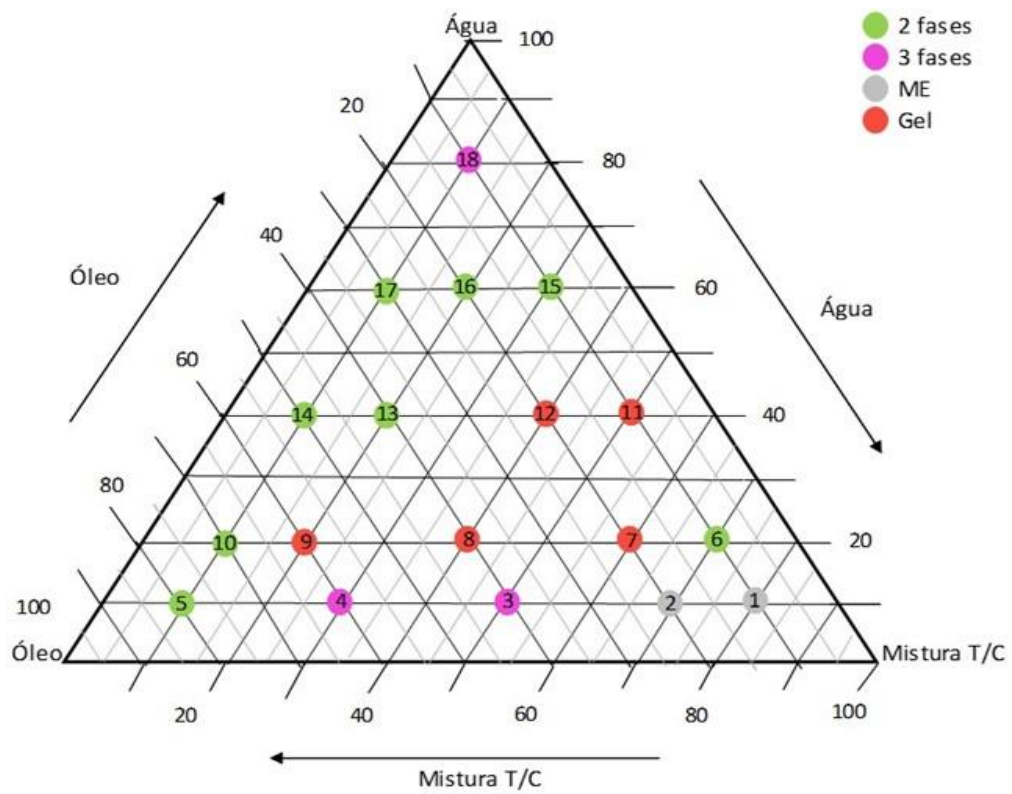


Figura A- 18: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (2:1)).

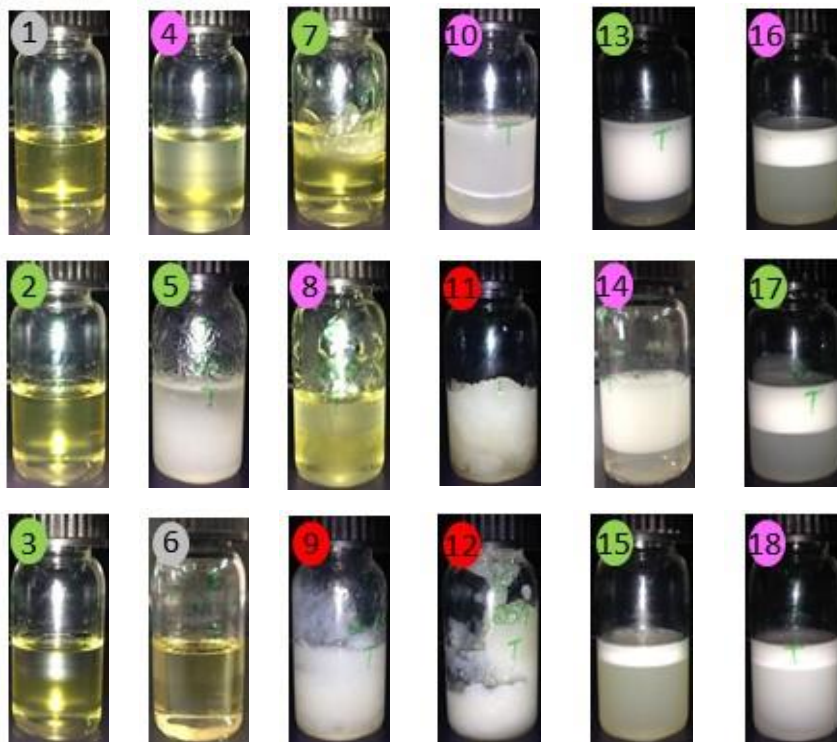
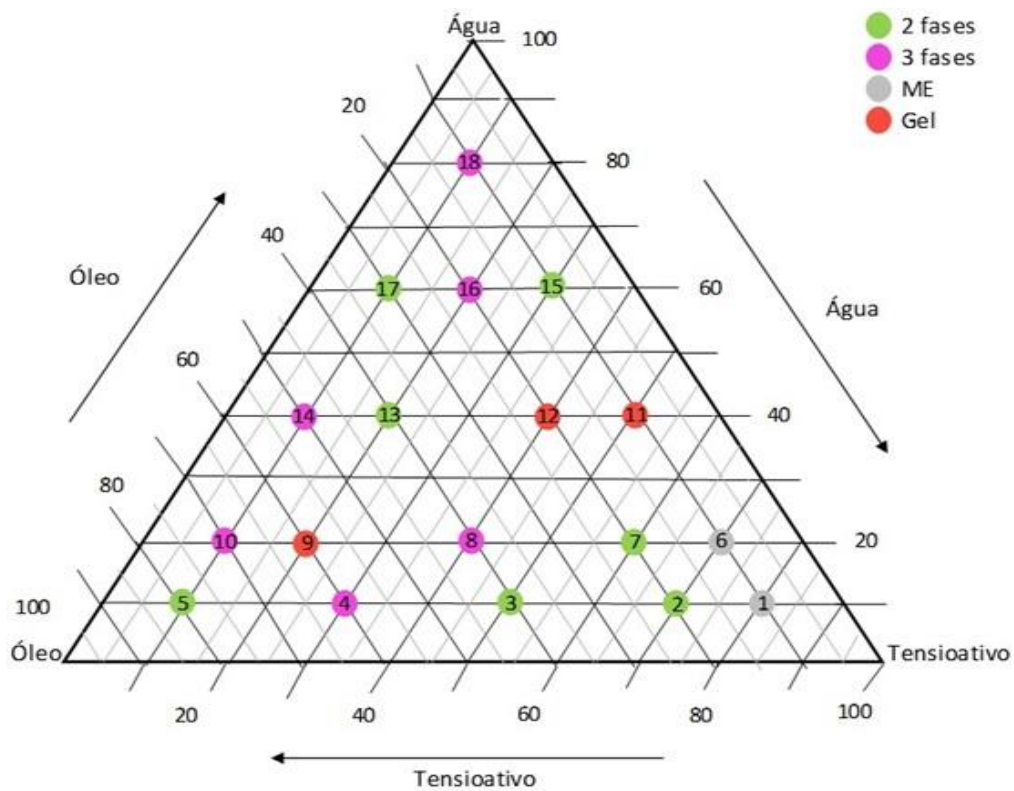


Figura A- 19: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 40°C).

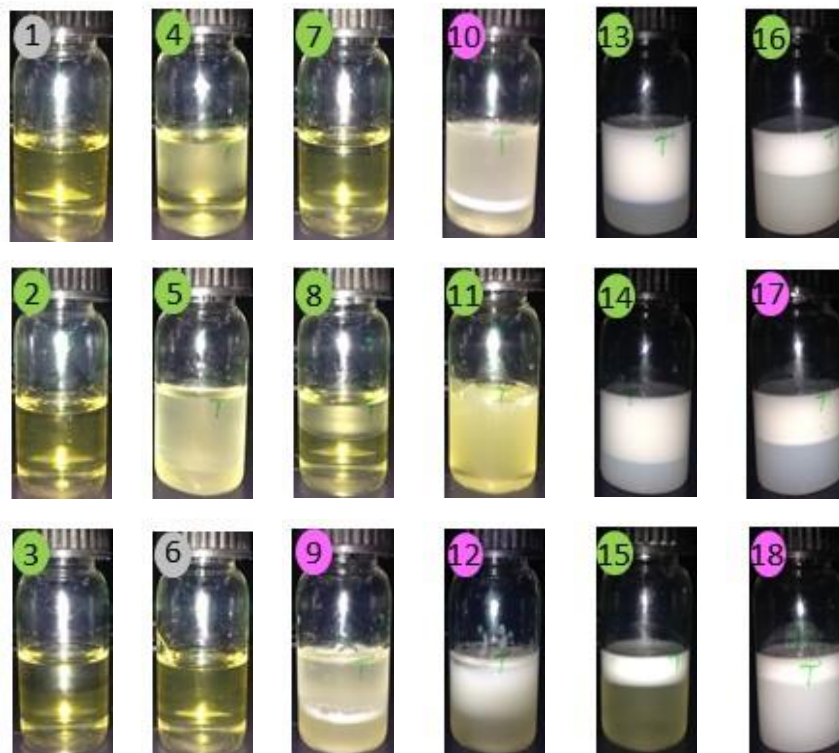
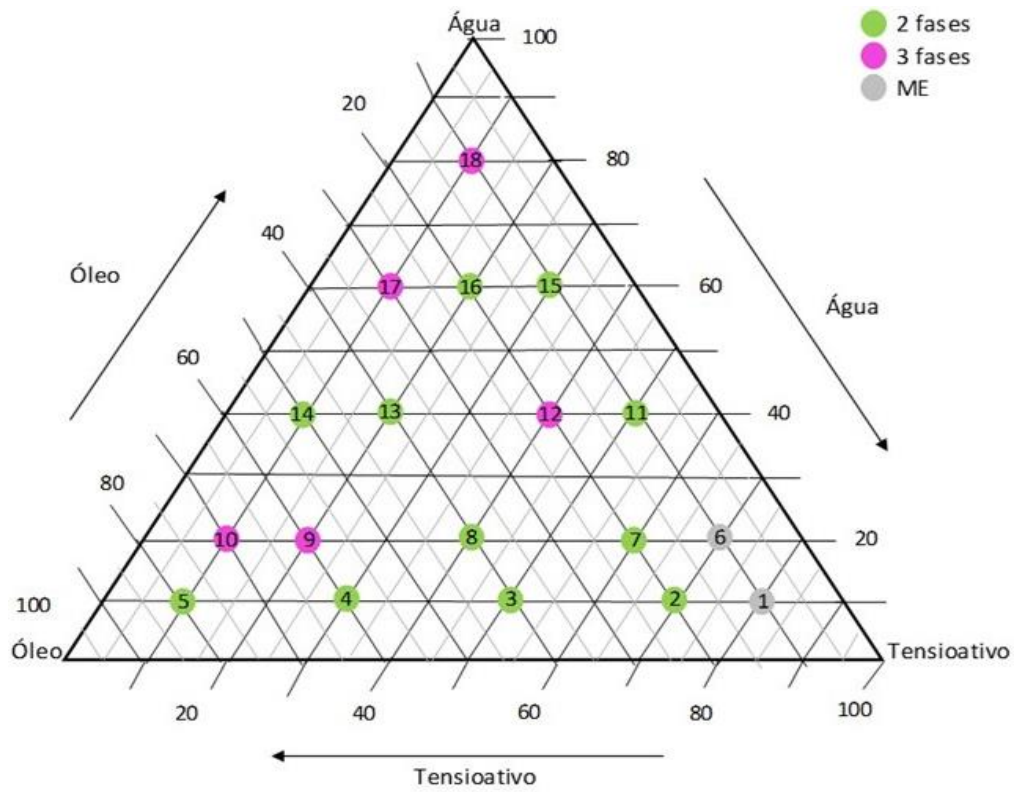


Figura A- 20: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 60°C).

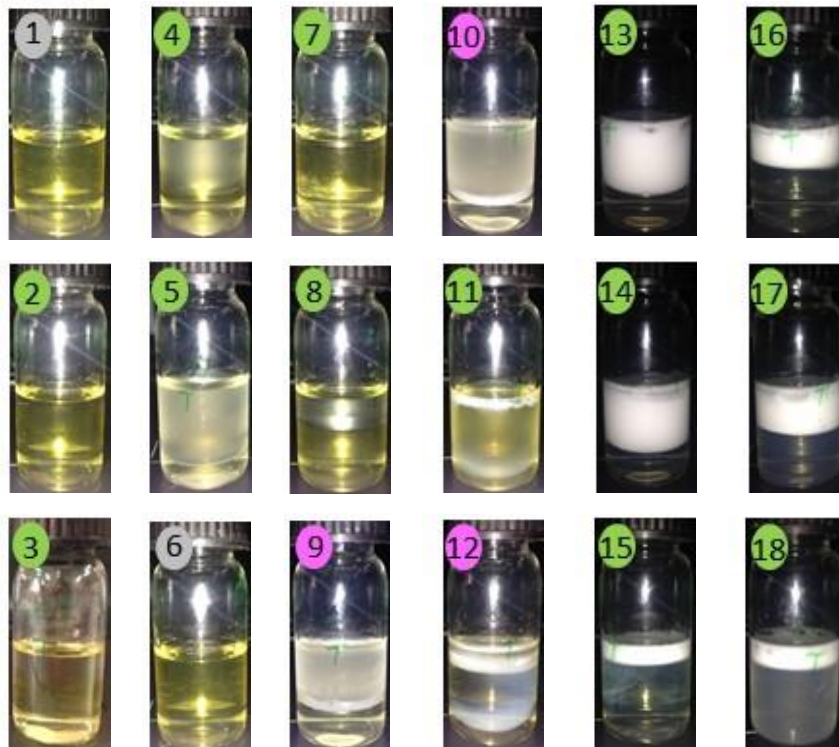
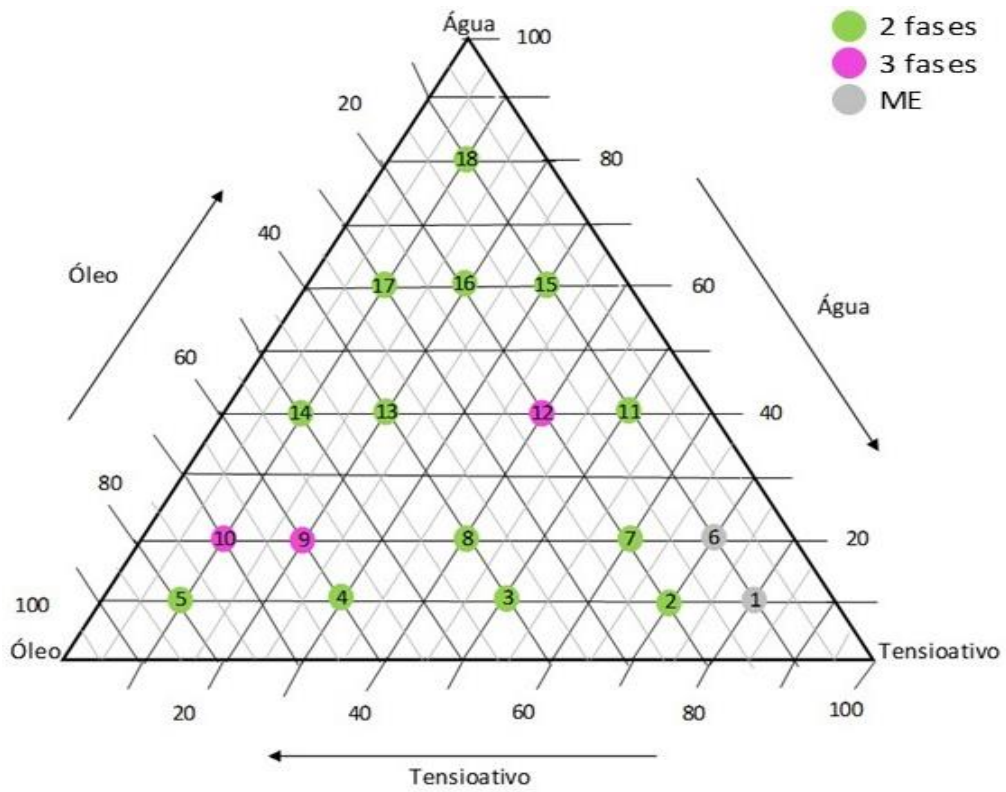


Figura A- 21: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama ternário (sistema: água + azeite + Tween 80, estudando o efeito da temperatura a 80°C).

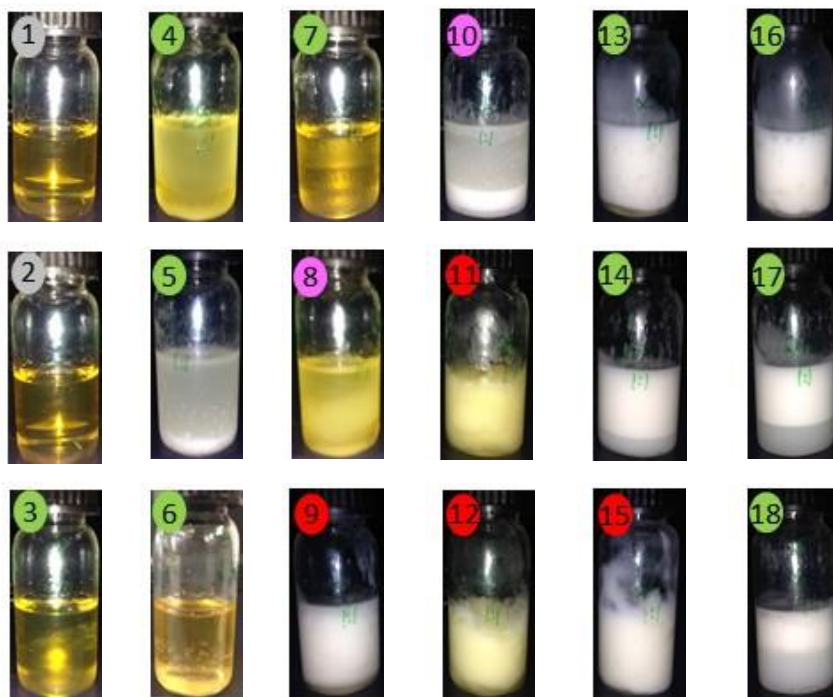
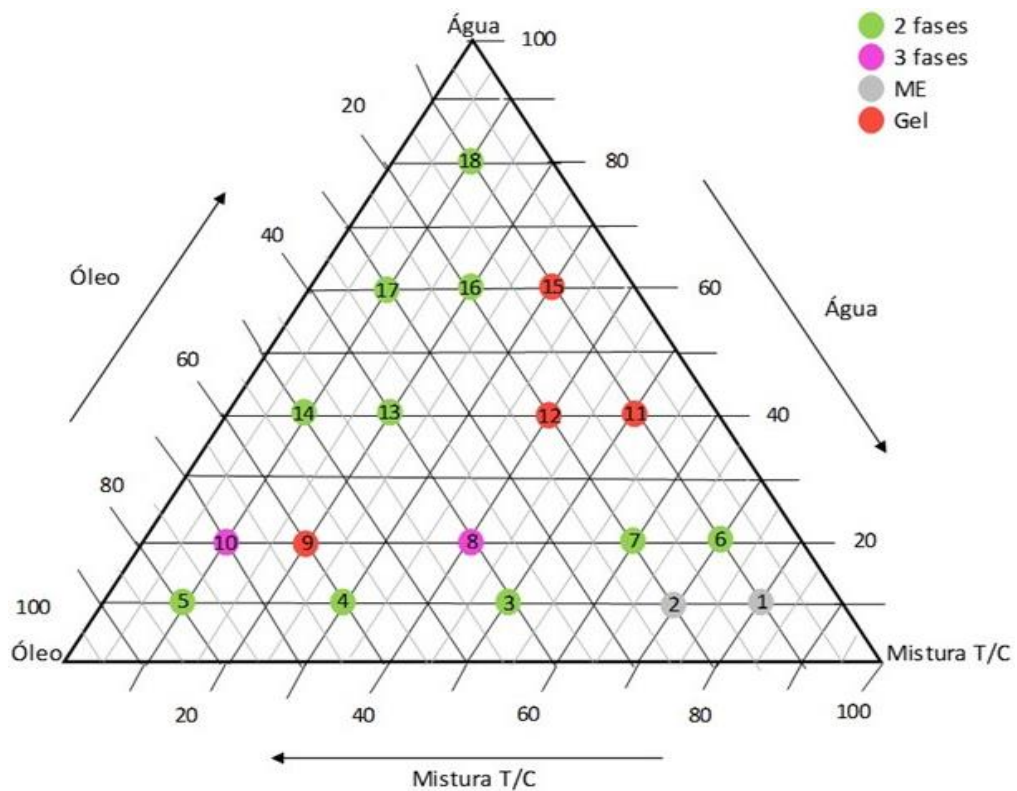


Figura A- 22: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 40°C).

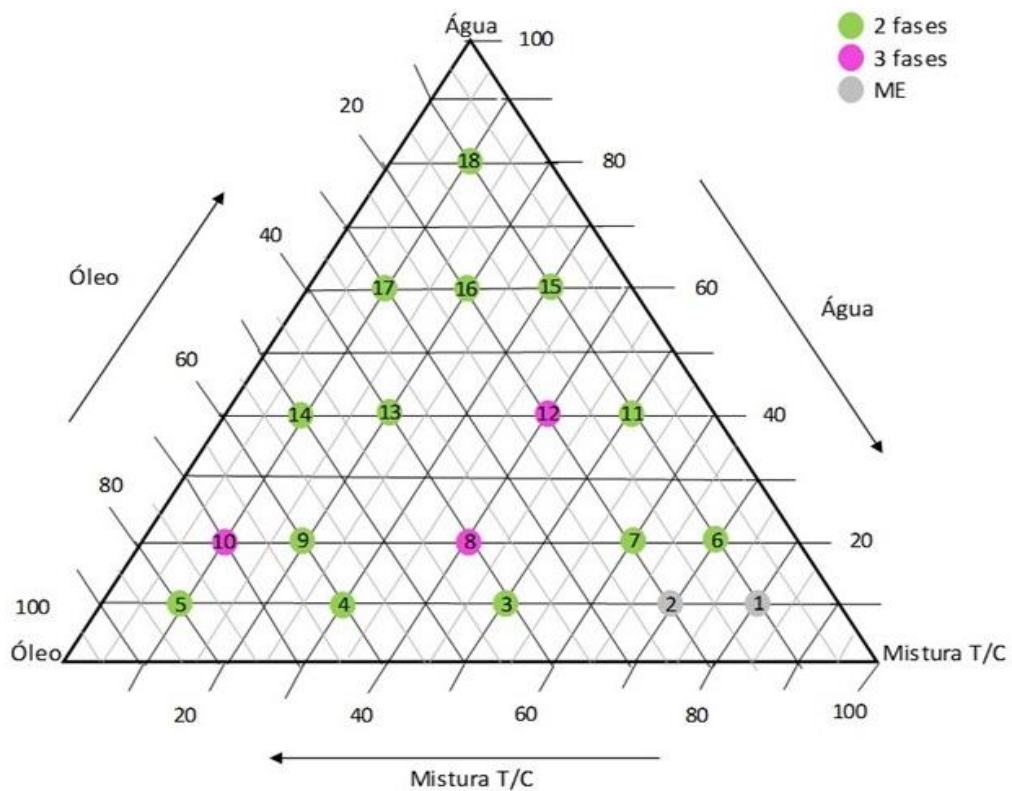


Figura A- 23: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 60°C).

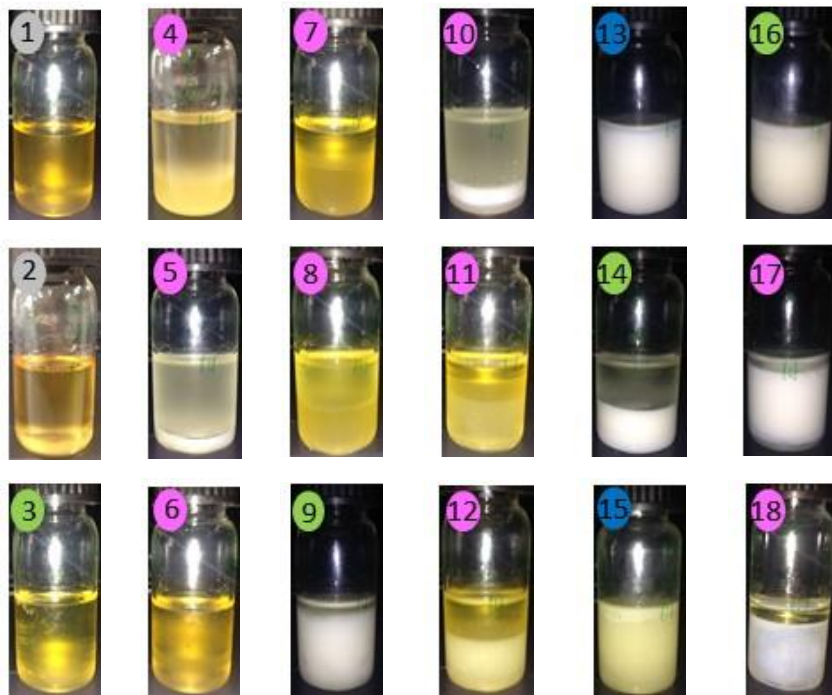
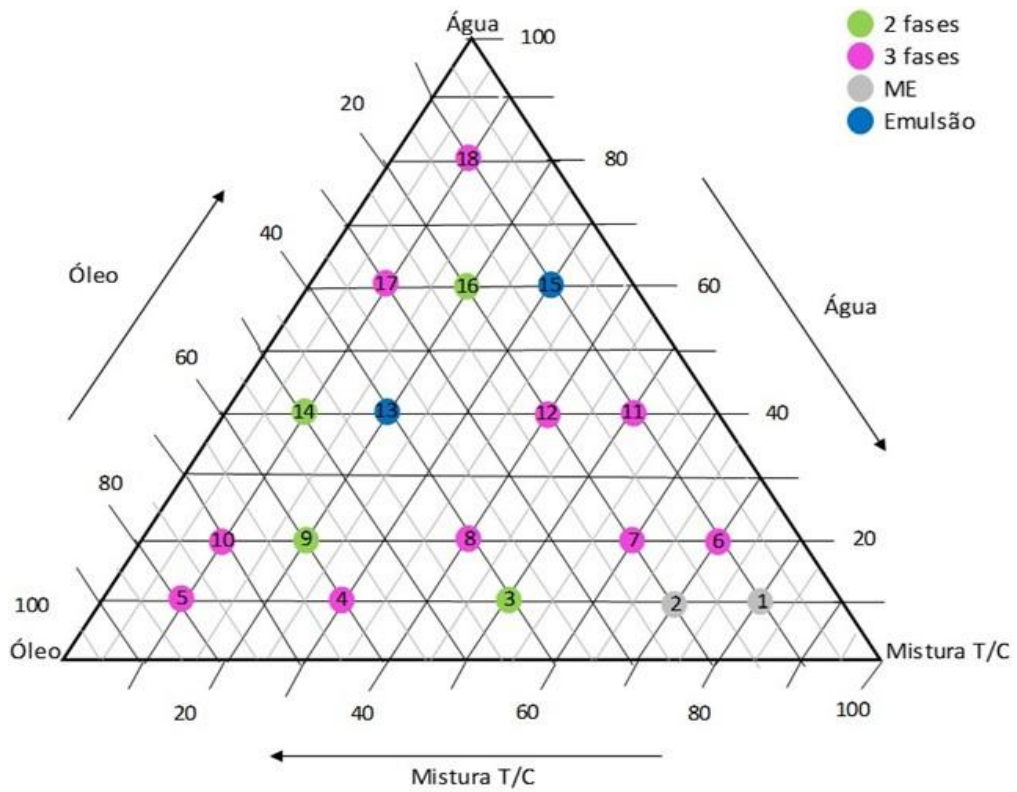


Figura A- 24: Diagrama de fases e registo fotográfico do aspeto das misturas individuais usadas na construção do diagrama pseudoternário (sistema: água + azeite + Tween 80/Span 80 (1:1), estudando o efeito da temperatura a 80°C).