

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA

ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Copaifera multijuga* Hayne:
APLICAÇÕES BIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E
DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

Thiago César Moreira

RIO BRANCO

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM
CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A
AMAZÔNIA

ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Copaifera multijuga* Hayne:
APLICAÇÕES BIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E
DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

Thiago César Moreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre *Strictu Sensu* em Ciências**. Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Orientador _____

Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria

Coorientador _____

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Rio Branco – Acre

Março 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

Thiago César Moreira

ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Copaifera multijuga* Hayne:
APLICAÇÕES BIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E
DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 17 / 04 / 2015

Prof. Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria
(Orientador – CCBN / UFAC)

Prof. Dr. Delano Anibal da Silva (Membro)
(Faculdade META – FAMETA)

Prof. Dr. Roberto Nicolete (Membro)
(FIOCRUZ / RONDÔNIA)

Dedicatória

Dedico a realização deste trabalho a Deus por ter me dado a paz, sossego, tranqüilidade e a força necessária para que pudesse desenvolver e concluir os meus objetivos, a minha mãe Maria Tereza Dorilêo de Paula Moreira, meu pai Nilton José Moreira Filho, minha esposa Andréia Moreira de Andrade, minha filha Maria Fernanda de Andrade Moreira e a meus irmãos pelo imenso apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria e ao coorientador Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez, pelo apoio científico na realização do trabalho, pois juntos, compõe a plataforma de equilíbrio técnico-experimental da pesquisa, e, acreditaram no escopo do seu desenvolvimento.

Ao Grupo de Pesquisa em Nanociência, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia (N&N&Nb).

Ao Departamento da Polícia Federal no uso do Laboratório da Perícia Criminal, em especial a perita Nathália Mai de Rose, pela colaboração nas análises cromatográficas.

À Professora Dra. Clarice Maia Carvalho pela colaboração na realização nos ensaios microbiológicos.

À Universidade Federal do Acre, ao PPG-CITA pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

Ao Professor Roberto Nicolete, que abriu as portas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – FIOCRUZ / RONDÔNIA.

Aos professores, que ofertam as disciplinas no programa de mestrado, pois, por mais diferentes que elas sejam, nos dão uma ampla noção das áreas de estudo e pesquisa, e que, no final, todos eles contribuíram de maneira funcional e essencial nesta pesquisa.

RESUMO

A espécie estudada é identificada como *Copaifera multijuga* Hayne (CMH), planta nativa da região tropical da América Latina e oeste da África. Utilizada na medicina popular pelas populações mais carentes da região Norte do Brasil; é também usada na fabricação de medicamentos com ação anti-inflamatória. No nosso trabalho foi extraído o óleo essencial (OE) a partir das folhas jovens da CMH, utilizando o método de hidrodestilação. O OE foi caracterizado por medidas físico-químicas, espectroscopia ultravioleta visível (UV-Vis), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IR-FT), cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). Foram avaliadas qualitativamente as atividades bactericidas do OE contra linhagem de células bacterianas *in vitro*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram preparadas nanoemulsões do OE, a fim de se observar atividade antimicrobiana e a toxicidade nos macrófagos. O (UV-Vis) demonstrou o comprimento de onda absorvido entre 251 até 264 nm, características das ligações químicas presentes de substâncias denominadas dienos conjugados. Pela técnica de (IR-FT) foi demonstrado os tipos de ligações entre carbono-carbono e carbono-hidrogênio, as saturações e insaturações envolvidas e as forças de suas ligações, caracterizando a presença de hidrocarbonetos classificados como terpenóides/sesquiterpenos. A análise de CG-MS identificou 63 compostos, cujos componentes majoritários são: Germacreno-D (37%), γ -elemeno (9,71%); transcadina-1(2), 4-dieno (8,91%); τ -muurolol (5,51%); τ -Cadinol (5,45%), Cariofileno (5,28%), α -Copaeno (2,72%). O OE foi eficaz contra esta espécie, uma linhagem de bactérias gram-positivas. A toxicidade em células de mamíferos do OE foi avaliada através dos testes de macrófagos de camundongos. O OE foi também tóxico para os macrófagos. Nas nanoemulsões, observou-se que não ocorreu citotoxicidade contra as células bacterianas nem contra macrófagos dos camundongos. O OE apresentou atividade bactericida contra células bacterianas, enquanto era acompanhado por uma toxicidade significativa para macrófagos.

PALAVRAS CHAVES: *Copaifera multijuga* Hayne. Óleo essencial. Espectroscopia. Nanoemulsão. Atividade citotóxica.

ABSTRACT

The species studied is identified as *Copaifera multijuga* Hayne (CMH), plant native to tropical regions of Latin America and West Africa. Used in folk medicine for the poorest populations of northern Brazil and is also used in the manufacture of medicaments with anti-inflammatory action. In our study was extracted essential oil (EO) from the young leaves of CMH, using the hydrodistillation method. The EO was characterized by physico-chemical measurements, ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), gas phase chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Were qualitatively evaluated the OE bactericidal activity against bacterial cells strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The OE nanoemulsions were prepared in order to study both antimicrobial activity and host toxicity (macrophages model). The UV-Vis demonstrated the absorbed wavelength from 251 to 264 nm, characteristics of the chemical bonds present in substances called conjugated dienes. Using the FT-IR techniques was demonstrated types of linkages between carbon-carbon and carbon-hydrogen, like saturated and unsaturated, the forces of their connections, this analyses shown the presence of hydrocarbons classified as terpenoids / sesquiterpenes. The GC-MS analysis identified the presence of 63 compounds in EO whose major components were: Germacrene-D (37%), γ -elemene (9.71%); transcadina-1 (2), 4-diene (8.91%); τ -muurolol (5.51%); τ -cadinol (5.45%), caryophyllene (5.28%), α -copaene (2.72%). The EO was effective against this species, a strain of Gram-positive bacteria. The toxicity OE mammalian cells was evaluated by the test of mice macrophages. The EO was also toxic to macrophages. In nanoemulsions, it was observed that there was no cytotoxicity against either bacterial cells or mice macrophages. OE showed bactericidal activity against bacterial cells, however it was accompanied by significant toxicity for macrophages.

KEYWORDS: *Copaifera multijuga* Hayne. Essential Oil. Spectroscopy.
Nanoemulsion. Cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Método tradicional da descoberta de drogas a partir dos produtos naturais | 21 |
| Figura 2 | Método moderno da descoberta de drogas a partir dos produtos naturais | 23 |
| Figura 3 | <i>Copaifera multijuga</i> Hayne | 27 |
| Figura 4 | Emulsão de um líquido disperso em outro | 33 |
| Figura 5 | Processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão | 35 |
| Figura 6 | Representação do Diagrama Ternário | 36 |
| Figura 7 | Molécula Anfifílica | 41 |
| Figura 8 | Hidrodestilador | 46 |
| Figura 9 | Balança eletrônica de precisão | 47 |
| Figura 10 | Área da coleta das folhas da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne | 48 |
| Figura 11 | Extração do óleo essencial das folhas da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne | 49 |
| Figura 12 | Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massa | 52 |
| Figura 13 | Sonicador | 53 |
| Figura 14 | Diagrama Ternário do OE da CMH, tensoativo e água | 56 |
| Figura 15 | Espectro da Absorvância do UV – VIS para o OE da CMH | 62 |
| Figura 16 | Espectro da Absorvância do FT – IR para o OE da CMH | 64 |
| Figura 17 | Rota biossintética dos sesquiterpenos | 65 |
| Figura 18 | Cromatograma do OE da CMH | 67 |
| Figura 19 | Nanoemulsões mais estáveis | 68 |
| Figura 20 | Potencial Size e Zeta da nanoemulsão do EHL = 12 | 69 |
| Figura 21 | Potencial Size e Zeta da nanoemulsão do EHL = 13 | 69 |
| Figura 22 | Potencial Size e Zeta da nanoemulsão do EHL = 14 | 69 |
| Figura 23 | Viabilidade celular das nanoemulsões em macrófagos de camundongos BALB/c | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1 | Classificação dos agentes emulsificantes de acordo com o seu EHL | 43 |
| Tabela 2 | Características dos tensoativos utilizados nas formulações | 53 |
| Tabela 3 | Massas dos tensoativos para as formulações de diferentes EHL | 55 |
| Tabela 4 | Composição das formulações para o estudo do EHL | 55 |
| Tabela 5 | Quantidade de água, tensoativos e óleo das formulações contidas no Diagrama Ternário | 56 |
| Tabela 6 | Rendimento do OE da CMH | 60 |
| Tabela 7 | Rendimento do OE da CMH reportado na literatura | 60 |
| Tabela 8 | Bandas de absorção para os picos encontrados no OE da CMH | 65 |
| Tabela 9 | Cromatograma gasoso das substâncias majoritárias encontradas no OE da CMH | 66 |
| Tabela 10 | Potencial Zeta, o tamanho e a dispersão das nanoemulsões das nanoemulsões para o EHL a 10% de tensoativo | 69 |
| Tabela 11 | Suscetibilidade da <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente ao OE da CMH | 71 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Equação 1 | Rendimento (%) do óleo essencial em base seca | 31 |
| Equação 2 | Equilíbrio hidrofílico – lipofílico | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|-----------------|---|---|
| OE | – | Óleo essencial |
| CMH | – | <i>Copaifera multijuga</i> Hayne |
| OECMH | – | Óleo essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne |
| EHL | – | Equilíbrio hidrofílico – lipofílico |
| NE | – | Nanoemulsão |
| UV – VIS | – | Ultravioleta visível |
| FTIR | – | Infravermelho com transformada de Fourier |
| CG – MS | – | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| PP | – | Poli Propileno |
| CIM | – | Concentração inibitória mínima |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 | JUSTIFICATIVA..... | 17 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 | Química dos produtos naturais..... | 18 |
| 2.1.1 | Produtos Naturais..... | 18 |
| 2.1.2 | Produtos naturais na medicina..... | 18 |
| 2.1.3 | A descoberta de medicamentos e os produtos naturais..... | 19 |
| 2.1.4 | A descoberta da droga a partir de produtos naturais: a maneira tradicional..... | 21 |
| 2.1.5 | A descoberta da droga a partir de produtos naturais: os processos modernos..... | 21 |
| 2.1.6 | Metabolismo secundário..... | 23 |
| 2.2 | <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 24 |
| 2.2.1 | Fitoquímica da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 27 |
| 2.3 | Óleos Essenciais..... | 27 |
| 2.3.1 | Métodos de obtenção de Óleos Essenciais..... | 29 |
| 2.3.1.1 | Hidrodestilação..... | 29 |
| 2.3.1.2 | Destilação por arraste a vapor..... | 29 |
| 2.3.1.3 | Extração por solventes orgânicos..... | 30 |
| 2.3.1.4 | Extração com fluído supercrítico..... | 30 |
| 2.3.1.5 | Cálculo do rendimento (%) do Óleo Essencial..... | 31 |
| 2.4 | Emulsões..... | 32 |
| 2.4.1 | Nanoemulsões..... | 34 |
| 2.4.1.1 | Formação das nanoemulsões..... | 35 |
| 2.4.1.2 | Diagrama Ternário..... | 36 |
| 2.4.2 | Métodos de emulsificação..... | 36 |
| 2.4.2.1 | Homogeneizadores de alta pressão..... | 37 |
| 2.4.2.2 | Emulsificação ultrassônica..... | 37 |
| 2.4.2.3 | Método de temperatura de inversão de fases (PIT)..... | 37 |
| 2.4.3 | Estabilidade das nanoemulsões..... | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.4.3.1 | Fatores de estabilidade das nanoemulsões..... | 39 |
| 2.4.3.2 | Fenômeno de maturação de Ostwald..... | 40 |
| 2.4.4 | Agentes emulsificantes..... | 41 |
| 2.4.5 | Equilíbrio hidrófilo – lipofílico (EHL)..... | 42 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 44 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 44 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 44 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 45 |
| 4.1 | Material..... | 45 |
| 4.1.1 | Balança eletrônica..... | 45 |
| 4.1.2 | Estufa Microprocessada de Secagem..... | 45 |
| 4.1.3 | Processador..... | 45 |
| 4.1.4 | Hidrodestilador..... | 46 |
| 4.1.5 | Balança eletrônica de precisão..... | 46 |
| 4.1.6 | Destilador de água..... | 47 |
| 4.2 | Metódos..... | 47 |
| 4.2.1 | Coletas das folhas..... | 47 |
| 4.2.2 | Seleção do material botânico..... | 48 |
| 4.2.3 | Extração do Óleo Essencial de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 48 |
| 4.2.4 | Caracterização físico – química do Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 49 |
| 4.2.4.1 | Índice de Refração..... | 49 |
| 4.2.4.2 | Medida do pH..... | 49 |
| 4.2.5 | Caracterização espectroscópica do Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 50 |
| 4.2.5.1 | Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta Visível..... | 50 |
| 4.2.5.2 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 50 |
| 4.2.6 | Análise Cromatográfica..... | 51 |
| 4.2.6.1 | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa..... | 51 |
| 4.2.7 | Desenvolvimento da nanoemulsão..... | 52 |
| 4.2.7.1 | Determinação do tamanho das partículas na nanoemulsão..... | 53 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2.7.2 | Determinação do EHL requerido do óleo essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 54 |
| 4.2.7.3 | Equacionamento do Diagrama Ternário da nanoemulsão mais estável para o OE da CMH, tensoativo e água..... | 56 |
| 4.2.7.4 | Avaliações da estabilidade da nanoemulsão..... | 57 |
| 4.2.8 | Teste de atividade biológica..... | 58 |
| 4.2.8.1 | Teste da viabilidade celular das nanoemulsões em macrófagos..... | 58 |
| 4.2.9 | Teste de atividade microbiológica..... | 58 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 60 |
| 5.1 | Rendimento do Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 60 |
| 5.2 | Caracterização físico – química do Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 61 |
| 5.2.1 | Índice de Refração..... | 61 |
| 5.2.2 | Medida do pH..... | 61 |
| 5.3 | Caracterização espectroscópica do Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 61 |
| 5.3.1 | Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta Visível..... | 62 |
| 5.3.2 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 63 |
| 5.4 | Análise Cromatográfica..... | 65 |
| 5.4.1 | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa..... | 65 |
| 5.5 | EHL requerido para o Óleo Essencial da <i>Copaifera multijuga</i> Hayne..... | 67 |
| 5.5.1 | Estabilidade das nanoemulsões..... | 67 |
| 5.5.2 | O Potencial Zeta, o tamanho e a dispersão das nanoemulsões..... | 68 |
| 5.6 | Teste da atividade biológica..... | 70 |
| 5.6.1 | Teste da viabilidade celular das nanoemulsões em macrófagos..... | 70 |
| 5.7 | Teste da atividade microbiológica..... | 71 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 72 |
| | REFERÊNCIAS..... | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo do desenvolvimento e da amplificação dos estudos etnobiológicos, corresponde ao entendimento da relação complexa entre a biota com o presente e passado das sociedades humanas. Entre as diversas áreas de investigação, apresenta-se como crucial os estudos experimentais ecológicos, os quais determinam e elucidam de que forma as pessoas se interagem com plantas e animais (DE DAVID *et al.*, 2014).

As experimentações associadas às plantas com caráter e aspectos medicinais nos procedimentos clínicos ocorrem de maneira bastante diversificada, desta forma, acabam difundidos e utilizados há muitos anos, desde os primórdios da história humana, sendo por vezes, usadas sem restrições, de forma indiscriminada, e assim, de maneira irresponsável. Estima-se que 80% da população de alguns países em desenvolvimento, por conta da carência ao acesso às medicações industrializadas, sintéticas e alopáticas, por vezes, são forçadas a utilizarem – se de preparações à base de plantas fitoterápicas e medicinais, no que se diz respeito aos cuidados básicos para a prevenção e promoção da sua saúde, dados estes, que chegam ao conhecimento da Organização Mundial da Saúde (BAST *et al.*, 2002). Igualmente, deve-se levar em consideração que alguns aspectos são relevantes, e, de extrema importância, quanto o estabelecimento da segurança, eficácia farmacológica e garantia ou controle da qualidade destas preparações, pois seu uso inadequado, sem o conhecimento do grau de toxicidade necessário, podendo ocasionar e/ou acarretar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos (SACHETTI *et al.*, 2009).

A fitoterapia é uma forma de terapia natural têm se expandido, que atualmente faz com que o mercado de fitoterápicos gire em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. No Brasil, vários grupos de pesquisa estão contribuindo para o avanço da química de produtos naturais provenientes de plantas. Com isto o país chega a exportar cerca de sete milhões de dólares em extratos vegetais (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001).

Os fitoterápicos são misturas de compostos, quantificados química e farmacologicamente, oriundos de extratos vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico.

Adjuvantes farmacêuticos, permitidos pela legislação vigente, podem ser utilizados para sua preparação (PEDROSO, SILVA e FURLAN, 2009).

Podemos afirmar como fármaco, uma molécula pura, com a sua estrutura determinada, e com a capacidade de produzir efeitos terapêuticos nos sistemas fisiológicos e estados patológicos, onde os efeitos secundários estão bem determinados, pois muitas vezes não são desejados. Portanto fitofármacos são moléculas puras obtidas de plantas e possuem uma ou mais substâncias ativas (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001)

Entretanto, têm-se observado que dentre o reino dos seres vivos que compõe o ecossistema do planeta, e, no que se refere às plantas e aos vegetais, estes, são dotados de uma excelente e ressaltada capacidade biossintética em relação ao seu metabolismo secundário e suas frações, tanto em relação à quantidade de substâncias produzidas quanto à presença de diversos constituintes na mesma espécie (OTTOBELLI *et al.*, 2011).

A Floresta Amazônica detêm o maior ecossistema de florestas tropicais do planeta, fazendo com que ocorra a procura e a investigação de plantas com caráter medicinal, na busca por novos princípios ativos, provocando assim, o interesse de muitas indústrias e laboratórios farmacêuticos e de grupos de pesquisas científicas no mundo todo, entretanto, espera-se que a floresta possa esconder em suas profundezas, e da maneira mais densa, as moléculas com propriedades terapêuticas dotadas da capacidade de tratar e solucionar as mais diversas doenças e enfermidades que agridem os seres vivos, e, provavelmente com a tecnologia disponível, existe a possibilidade de identificar, testar, modificar e disponibilizar estas substâncias em benefício à saúde dos seres vivos (OTTOBELLI *et al.*, 2011).

De maneira que, incorporado desta perspectiva, como também, a curiosidade que se faz presente, propõe-se em realizar estudos e avaliações do óleo essencial e suas frações voláteis da folha da espécie de *Copaifera multijuga* Hayne, visando à obtenção de bioativos para o desenvolvimento de fármacos sob uma nova visão, inserindo-o nas variadas possibilidades que a nanociência oferece em especial a nanobiotecnologia, ainda não pesquisados, cujo escopo seria a busca em obter nanoemulsões, uma vez que elas são biodegradáveis, biocompatíveis, fáceis de produzir e podem ser utilizadas como veículos para fármacos lipofílicos propensos à biotransformação. As nanoemulsões também têm sido avaliadas, estudadas, aplicadas e desenvolvidas para a administração de fármacos nas vias de acesso parenteral, enteral, oral, ocular, pulmonar e dérmica de fármacos e ativos, além de ser comumente utilizada em produtos

cosméticos, como loções para serem aplicadas na pele e no cabelo. O tamanho reduzido das partículas pode cobrir extensa área cutânea e, com isso, é indicada como sistema para liberação de ativos na pele (BERNARDI, 2011).

A efetividade presente na ação farmacológica esperada para tal composição possa ser elevada ou ainda maior, no que se diz respeito ao óleo na luta contra os agentes de origem microbiana, sua solubilização em meios aquosos, preservando e potencializando suas características biocompatíveis, seletividade ao tecido/célula-alvo e toxicidade para o tecido desejado. A presença de compostos com diversas ações farmacológicas, antiinflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antiparasitárias, antifúngicas, na composição da *Copaifera multijuga* Hayne, tem desencadeado a realização de vários trabalhos e pesquisas, com o intuito de isolar e estudar os tipos de componentes que aparecem.

1.1 JUSTIFICATIVA

O óleo obtido da resina da *Copaifera multijuga* Hayne é usado na medicina popular para o tratamento de diversas doenças por apresentar atividade bactericida, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, analgésica (RAMOS, 2006). Entretanto, até o presente momento, o potencial nanoestruturado do óleo essencial oriundo das folhas dessa espécie não foi relatado na literatura.

Pretende-se obter das folhas jovens da espécie de *Copaifera multijuga* Hayne o óleo essencial e suas frações voláteis; realizar estudos, ensaios de toxidez, parasitários, e posteriormente obter a nanoemulsão desse óleo. Aprofundar abordagem de sua utilização nos complexos nanoestruturados construídos a partir do acoplamento de drogas ou biomoléculas. Portanto caracterizar físico-quimicamente, espectroscopicamente e cromatograficamente o óleo essencial de folhas da espécie *Copaifera multijuga* Hayne; submetendo-o a ensaios biológicos, farmacológicos, desenvolver abordagem nanobiotecnológica mediante nanoemulsão, conferindo a essa espécie seu uso sustentável, justificam a realização desse trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Químicas dos produtos naturais

2.1.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais podem ser caracterizados de diferentes fontes de origem orgânica, tais como os organismos vivos que compõe o reino dos animais, vegetais, fungi, monera e protista. Os produtos naturais podem ser um organismo inteiro, uma parte de um organismo, um extrato de um organismo, ou composto puro, isolados a partir de plantas, animais ou microrganismos. No entanto, na prática, o termo produto natural refere-se aos metabólitos que seguem e surgem de vias secundárias, são as moléculas pequenas de peso molecular menor que 1.500 amu (unidade de massa atômica), produzidos por um organismo vivo, mas que estes, não são estritamente necessários ou essenciais para a sobrevivência e o desenvolvimento do organismo em questão (SARKER e NAHAR, 2007).

2.1.2 Produtos naturais na medicina

A aplicação do uso dos produtos de origem natural, e, em especial os que provêm do reino vegetal, no tratamento sistemático das cicatrizações e regeneração das células, é bem arcaico, antiquado e universal como o próprio medicamento em si. O uso das plantas com finalidades terapêuticas, certamente recobram para as civilizações sumariana e acadiana que existiram e habitaram na Terra, por volta de três mil anos antes da passagem de Jesus Cristo. Uma das figuras mais importantes ao longo dos relatos da história da saúde, e, por muitos considerado o “*pai da medicina*”, Hipócrates (460-377 a.C.), foi um dos primeiros observadores

e autores mais antigos, que descreveram os produtos naturais com características medicinais de origem vegetal e animal, listou cerca de 400 espécies diferentes de plantas para terapêutica medicinal. Inseridos como uma importante parte que integra, constitui, participa e estabelecem relações com os antigos sistemas da medicina tradicional, os produtos caracterizados como sendo de origem natural, eram amplamente utilizados na medicina chinesa e egípcia. Historicamente, ao longo dos anos, a utilização dos produtos para finalidades medicinais e terapêuticas, oriundos dos seres vivos do reino vegetal, e, associada com a sua eficácia, vêm atravessando o tempo e persistindo no seu uso por gerações, e, em especial no Oriente, aonde culturalmente eles fazem o uso de numerosos minerais, combinando – os com as substâncias extraídas dos animais e dos vegetais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,4 bilhões de pessoas no mundo em desenvolvimento, estão subordinadas ao uso de medicamentos à base de plantas medicinais. Isso nos revela que uma grande parcela dos habitantes do planeta depende principalmente da medicina tradicional para os seus cuidados primários de saúde. Essencialmente na China, 7.295 espécies de plantas são utilizadas como agentes medicinais (SARKER e NAHAR, 2007).

A principal fonte potencial dos agentes terapêuticos, que por milhares de anos é utilizada como estoque e reserva, provém da natureza. Através de suas fontes naturais de extração, um número que impressiona, é a quantidade de drogas modernas que foram bioprospectadas e obtidas. Durante todo o século passado, foram descobertas, isoladas e desenvolvidas uma série de novas drogas e princípios ativos a partir de produtos naturais. Além do uso dos produtos naturais derivado da medicina moderna, os produtos naturais também são utilizados diretamente na indústria farmacêutica "natural", denominada fitoterapia, que está a crescer rapidamente no continente Europeu e na América do Norte, assim como em programas de medicina tradicional a ser incorporada nos sistemas de cuidados de saúde primária no México, República Popular da China, Nigéria e outros países em desenvolvimento (SARKER e NAHAR, 2007).

2.1.3 A descoberta de medicamentos e os produtos naturais

Na ciência moderna estão inseridos vários conceitos, novos postulados e suas evoluções, e num dos mais recentes, destaca-se aqueles que estão diretamente ligados a descoberta de novas drogas, e que essa constatação na realidade, referente a essas novas drogas remonta muitos séculos, e tem suas origens na natureza, quando os seres humanos na busca incessante para a cura das doenças, se voltaram para aquilo que a Mãe Natureza pode oferecer, e, descobriram moléculas de drogas com propriedades terapêuticas e suas singularidades. Portanto, o termo produto natural tornou-se quase que um sinônimo, para com o conceito de descobrimento de novas drogas. Nos processos da descoberta, pesquisa e desenvolvimento das drogas modernas, aquilo que caracterizamos como sendo os produtos de origem natural, tem desempenhado um papel importante na fase inicial da descoberta, ou seja, na descoberta da molécula natural que apresenta o princípio ativo (determinada por vários bioensaios), que em si ou os seus análogos estruturais poderam ser candidato a um fármaco preciso e ideal (SARKER; NAHAR, 2007).

Na importância dos produtos naturais, podemos destacar a sua representatividade como uma reserva e fonte na bioprospecção e produção de novas drogas, para fins terapêuticos. Pode-se estimar que 61% das 877 pequenas novas entidades químicas de moléculas introduzidas como drogas em todo o mundo, entre os anos de 1981-2002, podem ser rastreadas, correlacionadas ou foram desenvolvidas a partir da sua origem advinda dos produtos naturais, onde 6% são produtos naturais, 27% derivados de produtos naturais, 5% compostos sintéticos derivados de produtos naturais e 23% compostos sintéticos concebidos com base no conhecimento adquirido a partir de um produto natural, ou seja, um mímico do produto natural, e, em sinergia com o mesmo. Em algumas áreas terapêuticas, a contribuição de produtos naturais é ainda maior, como por exemplo, cerca de 78% das drogas candidatas ao tratamento antibacteriano, ou com atividade bactericida, e 74% das drogas candidada ao tratamento do câncer, e relacionadas com sua atividade anticarcinogênica, são provenientes dos produtos caracterizados como naturais ou análogos estruturais de produtos naturais. Em 2000, cerca de 60% de todas as drogas em ensaios clínicos para a multiplicidade de tipos de câncer eram de origens naturais. Em 2001, oito dos 30 medicamentos mais vendidos eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais, classificados por sua origem, em fitoterápicos, e estas oito drogas juntas totalizaram 16 bilhões de dólares em vendas (SARKER; NAHAR, 2007).

2.1.4 A descoberta da droga a partir de produtos naturais: a maneira tradicional

Por meio do método tradicional, a descoberta de novas drogas a partir de produtos naturais, extratos brutos alvos de drogas são testados, e no caso de uma resposta positiva, ou seja, qualquer evidência de atividade, o extrato é fracionado e o composto ativo é isolado e identificado. Cada passo do fracionamento e do isolamento geralmente é guiado por bioensaios, e o processo é chamado de isolamento guiado por bioensaios. A Figura 1 apresenta uma visão geral do processo tradicional de descoberta de drogas a partir de produtos naturais (SARKER; NAHAR, 2007).

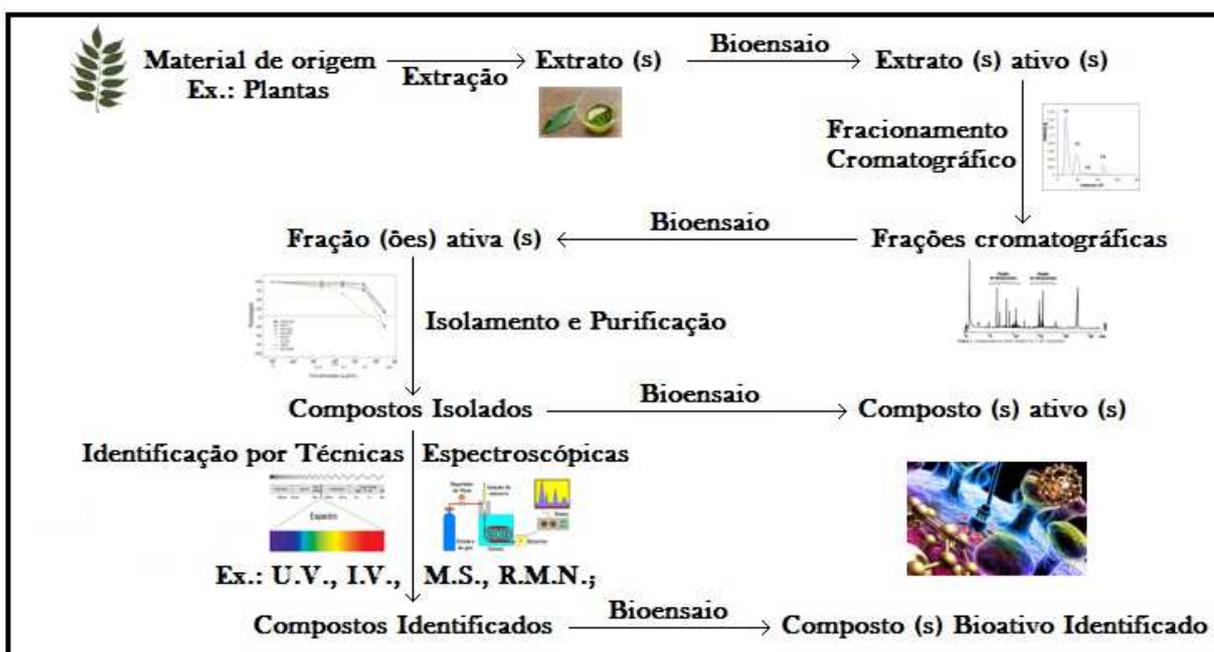


Figura 1. Método tradicional da descoberta de drogas a partir dos produtos naturais
Fonte: SARKER; NAHAR, 2007 (adaptado)

2.1.5 A descoberta da droga a partir de produtos naturais: os processos modernos

O desenvolvimento de pesquisas cujo escopo está direcionado na busca de novidades, e, em se tratando de essências e frações voláteis químicas bioativas, tem-se adotado de maneira singular e silenciosa, algumas inovações técnicas, como o uso da química combinatória, permitindo a aplicação de novos arranjos e permutações, obtendo desta maneira, um maior portfólio e quantidade de substâncias. A partir daí, através desta inovação tecnológica, as reações ocorrem em diversas etapas, podendo acontecer em paralelo ou em misturas, a partir de poucos reagentes. Os produtos reacionais resultantes são combinações aleatórias dos reagentes e, portanto, uma grande variedade de novas composições quimicamente viáveis pode ser elaborada (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Concomitantemente, também eclodiu a evolução e a propagação dos métodos de “screening” biológicos automatizados (“high throughput screening”– HTS), que passaram a consentir a possibilidade de uma avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento. Estes procedimentos, dada a sua capacidade em reproduzir os métodos exatos, e por sua vez, empregados de maneira simultânea e sincronizada, permitem a identificação de novos compostos dotados da habilidade em interagirem com os alvos-terapêuticos ensaiados em escala, inicialmente, micromolar e, atualmente, nanomolar. Cabe mencionar que graças ao emprego destas metodologias e engenhosidades combinadas surgiu o termo “hit”, definindo uma nova substância identificada pelo emprego destas estratégias, isto é, ativa *in vitro* sobre um alvo determinado, na escala indicada (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006). Com o intuito de adicionar e introduzir os produtos naturais nos programas HTS modernos, uma biblioteca de produtos naturais (uma coleção de produtos naturais desreplcado) precisa ser elaborado e arquitetado. Podemos, caracterizar a desreplcação pelo o processo no qual se pode extinguir a reincidência ou o re-isolamento de compostos análogos, parecidos ou equivalentes a partir de extratos que se divergem. Um número de técnicas combinadas é utilizado para desreplcação, por exemplo, LC-PDA (cromatografia líquida com detector de arranjo de foto-diodos), LC-MS (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.) e LC-NMR (cromatografia líquida acoplada a ressonância magnética nuclear) (SARKER; NAHAR, 2007).

A Figura 2 apresenta uma visão geral do processo moderno de descoberta de drogas a partir de produtos naturais.

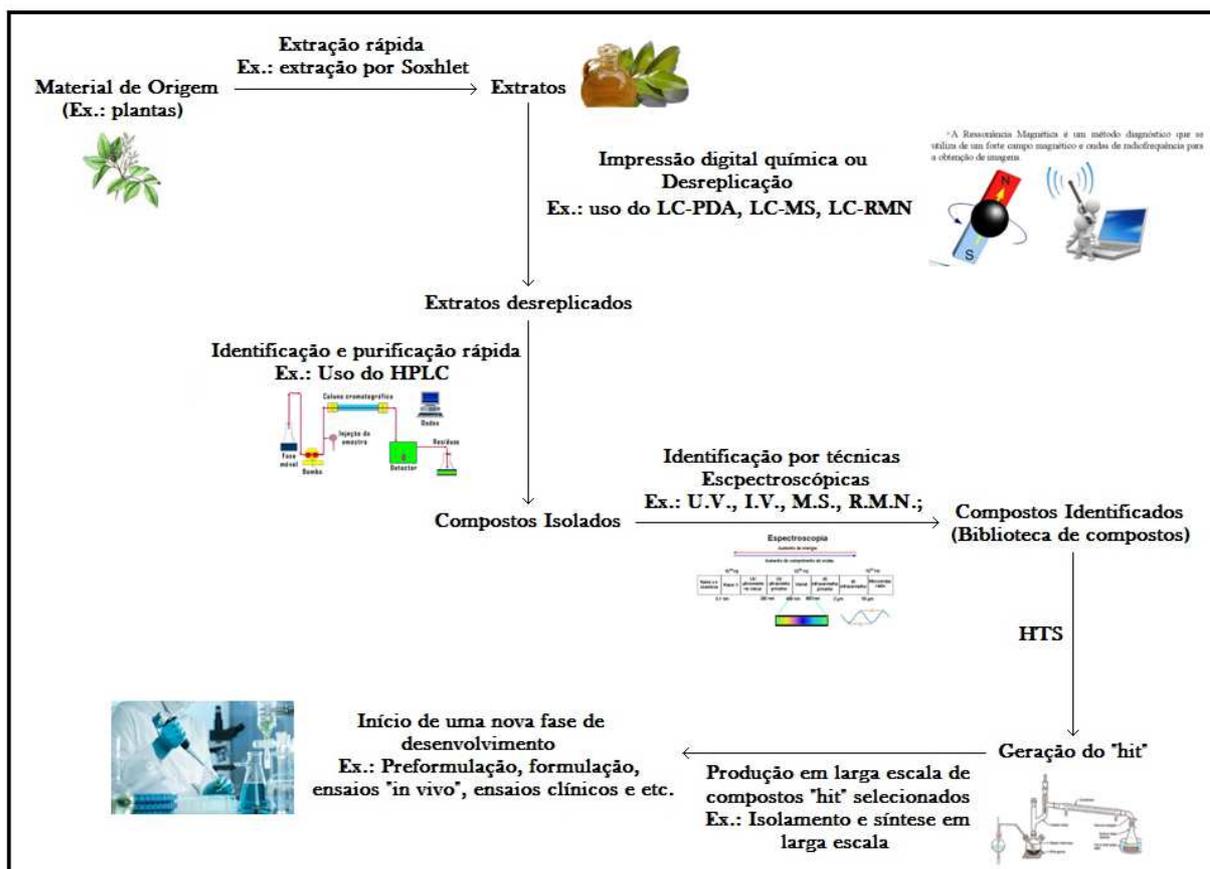


Figura 2. Método moderno da descoberta de drogas a partir dos produtos naturais
 Fonte: SARKER; NAHAR, 2007 (adaptado)

2.1.6 Metabolismo secundário

A presença dos metabólitos secundários demonstra e revela a especificidade singular de uma determinada espécie em termos químicos e são responsáveis por inúmeras funções na proteção, desenvolvimento e interação com o meio-ambiente. Os metabólitos secundários mais representativos são os terpenos e terpenóides, os alcalóides e os compostos fenólicos (SILVA JUNIOR, 2013).

Predominantemente, a classificação dos terpenos, está diretamente ligada com a quantidade de átomos de carbono existente nas suas estruturas químicas de 5, 10, 15, 20, 30 e 40. Ocasionalmente, toda vez que na sua constituição conformacional está contida a molécula de

oxigênio, estes são denominados de terpenóides. Sendo assim, pode-se dizer que existem mais de 20.000 terpenos e terpenóides conhecidos, produzidos por vegetais e outros organismos terrestres e marinhos, inclusive animais, fungos e bactérias. Sua diversidade estrutural é tão ampla que podem ser encontrados compostos com 5, 10, 15, 20, 30 ou 40 átomos de carbono. São conhecidos, respectivamente, como *hemi*, *mono*, *sesqui*, *di*, *tri* e *tetraterpenos*, com as mais distintas formulações estruturais, apresentando diferentes constituintes. Logo, alguns são identificados como hidrocarbonetos simples, outros contêm em sua estrutura oxigênio ou nitrogênio ligado às cadeias de carbono. Muitos monoterpenos e sesquiterpenos, por serem compostos voláteis, compõem os óleos essenciais (SILVA JUNIOR, 2013).

Inicialmente, os metabólitos caracterizados como alcalóides, apresentam-se como compostos nitrogenados que podem ser encontrados em seres vivos de origem microbiana, vegetal ou de animais, tanto terrestres quanto marinhos. Muitos são reconhecidos através do seu paladar, sendo pelo sabor amargo e por suas propriedades básicas (de álcali), apesar de não serem características comuns a todos os compostos desta classe. Boa parte desta família é derivada de aminoácidos e assim como os terpenos constitui uma classe ampla e diversificada em termos estruturais. Servindo como exemplo de alcalóides, temos a morfina, obtida da papoula, a cocaína, obtida da folha da coca, a cafeína, estimulante encontrado no café, a nicotina, isolada do tabaco, e a atropina, isolada da beladona (SILVA JUNIOR, 2013).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande variedade estrutural e tem por característica a presença de um grupamento hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. Neste grupo estão presentes os flavonóides, presentes no vacúolo das plantas, a exemplo da quercetina que é encontrada nas cascas das frutas; os taninos, que conferem sabor adstringente às folhas de plantas lenhosas, como o ácido digálico; as ligninas, superadas apenas pela celulose em abundância na natureza, são polímeros que conferem rigidez, resistência e impermeabilidade à parede celular de plantas (SILVA JUNIOR, 2013).

2.2 *Copaiifera multijuga* Hayne

A família Leguminosae está representada por cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies. É uma das maiores famílias das dicotiledôneas, e encontra-se amplamente

distribuída em todo mundo, ocupando todos os habitats, além de ser dotada de expressiva importância econômica. As sementes, os legumes verdes, as folhas, as raízes e as flores de muitas Leguminosae fornecem alimentos ricos em proteínas para os homens e animais. Alguns dos melhores copais ou resinas viscosas, largamente usadas na produção de vernizes, tintas e lacas, são produzidos de árvores de Leguminosae, especialmente dos gêneros *Hymenaea* e *Copaifera*. As Leguminosae são também usadas como plantas medicinais, inseticidas, condimentos, aromatizantes e vários outros empregos na culinária (ALMEIDA, 2009).

A subfamília botânica das Caesalpinioideae pertence à família das Leguminosae, contando com aproximadamente 154 gêneros e 2.800 espécies. Trata-se de um grupo pantropical, ou seja, sendo caracterizados pela sua ocorrência em diversos tipos de habitats, e, apresentando uma grande variabilidade de estruturas reprodutivas e vegetativas. Dentro das Leguminosae, a subfamília Caesalpinioideae tem sido tratada como a mais primitiva e a menos entendida até o momento. A maioria dos gêneros encontra-se nos trópicos, na África, América e Sudeste da Ásia, com grande ocorrência no Brasil, para onde foram citadas cerca de 790 espécies (ALMEIDA, 2009).

O nome do gênero *Copaifera*, deriva de uma combinação de palavras da língua tupi, comumente usada para descrever a resina da árvore de copaíba “Copai” e o termo do latim “fero” que significa carrega ou produzir. Estas árvores são conhecidas popularmente, como copaibeira ou pau d’óleo, e são adaptadas a uma grande variedade de ambientes. Sendo por sua vez, distribuídas em floresta de terra firme, terras alagadas, margens de lagos e igarapés da bacia Amazônica e nas matas do Cerrado do Brasil Central. São encontradas tanto em solos arenosos como argilosos e, geralmente seus espécimes adultos ocupam o dossel da floresta ou emergem ocasionalmente. O gênero *Copaifera* é formado por 72 espécies, sendo 16 nativas do Brasil, ocorrendo no norte da América do Sul, principalmente nas regiões Amazônica e Cerrado. Entre as espécies mais abundantes destacam-se *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart., *C. cearensis* Huber ex Ducke. Entretanto, oito espécies do gênero *Copaifera*, estão distribuídas na Floresta Amazônica Brasileira, *C. glycyarpa* Ducke, *C. guyanensis* Desf., *C. martii* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Ducke, *C. pubiflora* Benth e *C. reticulata* Ducke. Economicamente e muito viável, o gênero *Copaifera* é importante tanto a nível comercial quanto industrial. As espécies deste gênero são em geral árvores de alto porte, casca

aromática, folhagem densa, flores pequenas, frutos secos, do tipo vagem monospérmica e deiscente. As sementes são de cor preta, ovóides, com um arilo amarelo rico em lipídeos (ALMEIDA, 2009).

A *C. multijuga* Hayne, é caracterizada por ser uma árvore de grande porte (Figura 03), sua distribuição geográfica vai desde Amazônia central no estado do Pará, até o extremo ocidental nos estados do Amazonas e Rondônia, estendendo-se, ainda, até o sudoeste da Amazônia, no estado de Mato Grosso do Sul. Estas árvores podem chegar até 30 metros de altura. Em se tratando da *C. multijuga* Hayne, sua floração ocorre entre janeiro e abril e a frutificação entre março e agosto. O óleo-resina extraído do tronco da copaíba, quanto ao aspecto biológico, é um produto secundário e como tal, não faz parte do metabolismo primário. Desta forma, é considerado um produto de excreção ou de desintoxicação que funciona como defesa da árvore contra animais, fungos e bactérias. O óleo é encontrado no interior do tronco, em canais secretores, na região cortical dos caules, porém dispostos de modo que se prolongam até o lenho, onde existem em notável abundância, formando bolsas. Este óleo é utilizado popularmente como antiinflamatório, antiasmático, antiulcerogênico, expectorante, analgésico, anestésico, bactericida, anti-séptico e para o tratamento de sinusite, disenteria, bronquites, infecções broncopulmonares, mordida de cobra, doenças urinárias e no combate de diferentes tipos de câncer. Sendo aplicado e administrado pela via externa sobre as feridas muito inflamadas como a psoríase, urticárias, úlceras e todos os tipos de dermatoses. Ainda, segundo informação popular, o óleo de copaíba é utilizado no combate ao mal-de-chagas e a leishmaniose, doenças que atingem mais de oito milhões de brasileiros e contra as quais não existem ainda drogas eficazes (ALMEIDA, 2009).

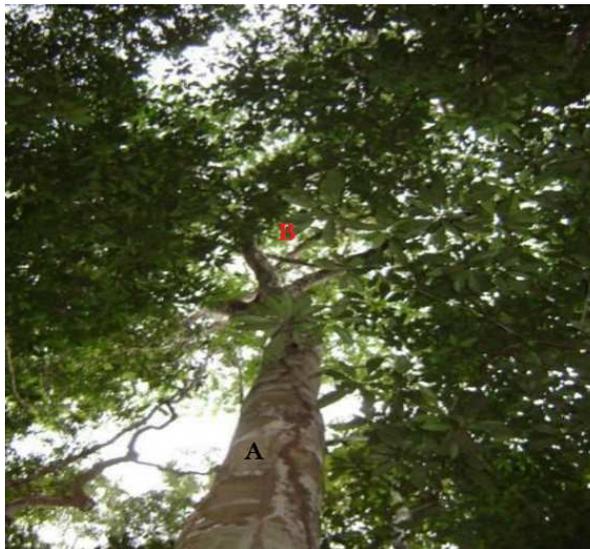


Figura 3. *Copaífera multijuga* Hayne: (A) tronco da árvore adulta; (B) folhas jovens e adultas. Foto: Thiago César Moreira

2.2.1 Fitoquímica da *Copaífera multijuga* Hayne

Podemos evidenciar vários fatores que podem contribuir para a composição, a concentração e o percentual dos constituintes químicos do óleo essencial de um vegetal, e, entre estes fatores encontra-se a diversidade genética, o habitat e os tratamentos culturais. A fragmentação do habitat é a redução de uma área contínua de habitat, e a sua divisão em fragmentos apresenta maior quantidade de borda do que o habitat original. O principal efeito de borda é a alteração do microclima, caracterizada pelo aumento da penetração de luz, temperatura, vento e umidade. Tais diferenças no microclima podem influenciar sobre a germinação, predação, herbivoria e crescimento vegetal. As plantas respondem, aos predadores, produzindo metabólitos secundários, os quais são capazes de protegê-las da herbivoria, e ao mesmo tempo, a capacidade de atrair polinizadores. Quanto à sua composição química do óleo resina e do óleo essencial é constituída, principalmente, por sesquiterpenos e ácidos diterpênicos, porém, há concentrações diferenciadas entre as espécies (ALMEIDA, 2009).

2.3 Óleos Essenciais

Os compostos aromáticos voláteis, caracterizados como óleos essenciais (OEs), correspondem aos produtos naturais de plantas de grande interesse e entre outras qualidades

possuem diversas propriedades biológicas. O termo "biológico" compreende todas as atividades que estas misturas de compostos orgânicos voláteis (principalmente mono e sesquiterpenoids, benzenóides, fenilpropanóides, etc.) exercem sobre os seres humanos, animais e outras plantas (BASER e BUCHBAUER, 2009). Os OEs são menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em baixas concentrações, em glândulas especiais da planta, denominadas tricomas (SILVEIRA, 2012).

No que diz respeito aos OEs, são definidos como compostos naturais complexos, sendo determinados de maneira singular através de um forte odor e são sintetizado por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Eles são normalmente obtidos por arraste a vapor ou hidro-destilação, técnica desenvolvida pela primeira vez na Idade Média pelos árabes. Conhecido por suas propriedades antissépticas, ou seja, bactericida, virucida e fungicida, e também pela sua fragrância e pelas propriedades medicinais, os OEs eles são utilizados na preservação de alimentos, como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, medicamentos anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolítico (BAKKALI *et al.*, 2008).

Nos ecossistemas e na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo a predileção por tais plantas. Outrossim, eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir insetos indesejáveis (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado e tropicais, onde eles representam uma parte importante da farmacopéia tradicional. Os OEs podem ser sintetizados por todos os órgãos e estruturas morfofuncionais da planta, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, talos, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI *et al.*, 2008).

No que se refere aos métodos para a extração dos óleos essenciais, diversas metodologias se destacam, e, o produto da extração pode variar em qualidade, já quanto ao seu rendimento, o associamos ao volume e quantidade. No que se diz respeito a sua composição, esta pode variar de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo.

Assim, a fim de se obter óleos essenciais de composição constante, o mesmo tem de ser extraído sob as mesmas condições, ou seja, a partir do mesmo órgão da planta que tenha crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima e na mesma estação. A técnica mais utilizada para identificação dos componentes presentes nos OEs tem sido por cromatografia em fase gasosa e análise de espectrometria de massa (BAKKALI *et al.*, 2008).

2.3.1 Métodos de obtenção de Óleos Essenciais

Na atualidade, existem várias técnicas de extração de OEs, onde podemos citar a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, dentre outros.

2.3.1.1 Hidrodestilação

A extração por hidrodestilação é caracterizado por ser um método antigo, simples, viável e barato, onde o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. A mistura de óleo e água em forma de vapor passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento, formando duas fases líquidas imiscíveis que podem ser separadas. Na extração de OE em pequena escala a partir do método de hidrodestilação é empregado o aparelho tipo Clevenger acoplado a um balão de vidro sobre uma manta aquecedora (SILVEIRA, 2012).

2.3.1.2 Destilação por arraste a vapor

Neste processo, a destilação por arraste a vapor é uma operação unitária, utilizada principalmente para materiais sensíveis à temperatura, sendo baseada na diferença de volatilidade de determinados compostos presentes na matéria-prima vegetal. Na extração por arraste a vapor

utiliza-se uma caldeira para geração de vapor, um extrator (destilador), onde será colocada a matéria prima de onde será extraído o óleo, um condensador e um frasco de coleta (vaso florentino). O vapor é percolado através do leito de sólidos, no interior do vaso extrator, arrastando o óleo essencial. A mistura vapor-óleo segue então para o condensador, onde ocorre a mudança de fase. O condensado é alimentado no vaso florentino, onde ocorre a separação das fases. Posteriormente o óleo essencial é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade (SILVEIRA, 2012).

2.3.1.3 Extração por solventes orgânicos

O processo de extração utilizando solventes orgânicos resume em atribuir, e colocar um solvente em contato com a matriz vegetal durante um intervalo de tempo suficiente para que ocorra a transferência dos constituintes solúveis presentes na planta, e em seguida efetua-se a separação das fases sólida e líquida. O óleo é obtido pela evaporação do solvente presente na fase líquida. Os solventes mais comumente utilizados são hexano, benzeno, metanol, etanol, propanol, acetona, pentano e diversos solventes clorados tendo-se preferência por solventes apolares. As principais características que o solvente deve ter são: a seletividade, uma baixa temperatura de ebulição, ser quimicamente inerte e possuir um baixo custo. Na contramão deste, a sua desvantagem neste método é que, junto com o óleo essencial, o solvente também retira ceras e pigmentos da matéria prima, que são caracterizados como contaminantes do óleo (SILVEIRA, 2012).

2.3.1.4 Extração com fluido supercrítico

Inicialmente, através da elevação da temperatura e pressão, devidamente representadas pelo ponto crítico, os gases não mais podem ser liquefeitos, e, isso ocorre em função do aumento da densidade, onde passam para o que alguns consideram um estado intermediário entre o líquido e o gasoso: tornando-se "supercríticos" e podem então agir em parte como solventes. A extração

por fluidos supercríticos apresenta a característica do meio extrator ser um gás, entretanto, este apresentará uma elevada densidade de modo que conseguem elevar as suas interações polares, e com isso, a seletividade do poder extrativo é muito mais intensa comparando – se a um gás comum e a difusão de outras substâncias nele, são mais reduzidas (MAUL, WASICKY e BACCHI, 1996).

Na extração por fluido supercrítico, o material a ser extraído é colocado num recipiente cilíndrico com bases porosas e em seguida é colocado na câmara de extração. Seleciona-se a temperatura e a pressão ideais para o material específico a ser extraído e para o produto final desejado. Circula-se o gás supercrítico através do material contido na câmara de extração até a completa dissolução das frações desejadas. Após completar o ciclo de extração, transfere-se a solução para um separador, onde a pressão é mantida abaixo do ponto crítico. O fluido supercrítico então passa para o estado gasoso à medida que a pressão diminui tornando possível a precipitação do soluto que em seguida será coletado (MAUL, WASICKY e BACCHI, 1996).

2.3.1.5 Cálculo do rendimento (%) do Óleo Essencial

O rendimento do óleo essencial extraído pode ser calculado com base na matéria seca ou base livre de umidade (BLU) e na matéria úmida ou base úmida (BU), onde o método que utiliza a matéria seca é um método padronizado, podendo ser repetido a qualquer momento, já o método BU é impreciso, não apresenta repetibilidade e induz a grandes desvios em virtude de que não se pode levar em conta a verdadeira quantidade de biomassa seca utilizada (ALMEIDA, 2009).

No cálculo do rendimento da extração de óleo essencial utilizando o método BLU, temos a seguinte equação:

$$TO = \frac{V_o}{E_m - \left(\frac{E_m \times U}{100}\right)} \times 100 \quad (1)$$

onde,

TO = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração (%).

V_o = volume de óleo extraído (ml), lido diretamente na escala do tubo separador.

B_m = biomassa aérea vegetal (folhas e ramos finos), medida em gramas.

$\left(\frac{B_m \times U}{100}\right)$ = quantidade de umidade ou água presente na biomassa.

$B_m - \left(\frac{B_m \times U}{100}\right)$ = quantidade de biomassa seca, isenta de água ou livre de umidade.

100 = fator de conversão para porcentagem.

O valor calculado por essa equação expresso em porcentagem corresponde ao volume/massa (mL de óleo essencial por 100 g de biomassa seca), indicando o teor de óleo contido na biomassa seca.

2.4 Emulsões

Podemos afirmar e caracterizar uma emulsão, quando se observa a mistura entre dois líquidos imiscíveis, nessas condições existe a tendência para um dos líquidos tornarem-se disperso no outro, na forma de finos glóbulos no seio do outro líquido, desde que haja alguma força mecânica atuando. Mas quando retirada esta força, os dois líquidos puros irão se separar. Logo, denomina-se emulsão aos sistemas que assim persistem por um período de tempo razoável (poucos segundos a vários anos), e, de certo modo, formando uma mistura estável (BURGUERA e BURGUERA, 2012). Sendo assim, torna-se mais interessante para muitas aplicações que na emulsão possa existir uma estabilidade por um longo período de tempo; outras vezes, é necessário reduzir sua estabilidade para que sejam “quebradas” em alguns processos dinâmicos, onde as mesmas causam problemas (Figura 4). Então, destaca-se que uma emulsão possui duas fases, a fase dispersa é chamada fase interna e a fase contínua é chamada fase externa. Assim sendo, atribui-se de maneira usual como sistemas óleo/água (O/A), quando a fase interna não é a água, sendo esta a fase contínua. O inverso é o sistema água/óleo (A/O), deixando claro que nesta linguagem considera-se “óleo” praticamente todos os líquidos hidrofóbicos não polares e “água” os líquidos hidrofílicos altamente polares (PONZIO, 2006). Inicialmente, as fases óleo e água seriam compostas de apenas de uma substância mais cada uma das fases costuma conter vários “componentes”. Existe também outro tipo de emulsões chamadas emulsões múltiplas, são

sistemas designados emulsões de emulsões. Nestes sistemas, as gotículas da fase dispersa também contêm gotículas menores dispersas dentro delas (PONZIO, 2006).

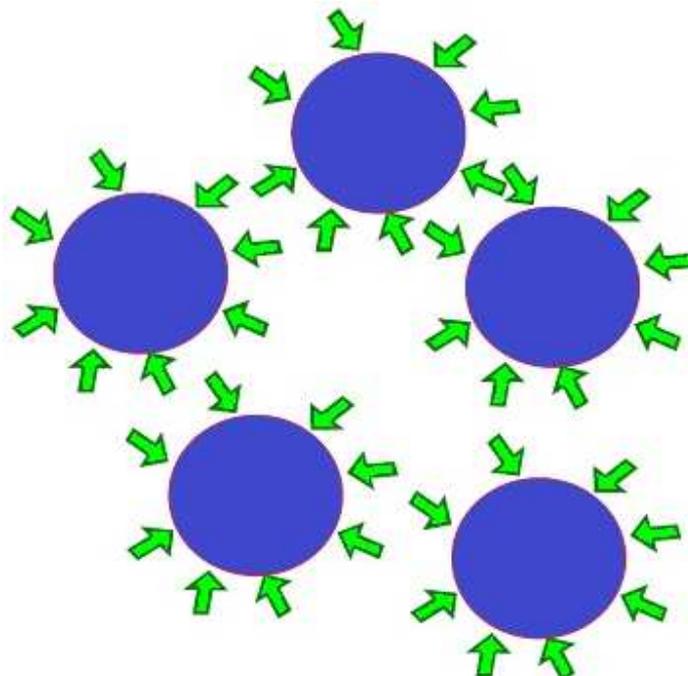


Figura 4. Emulsão de um líquido disperso em outro. O dispersante é um tensoativo, um polímero ou um pó que apresenta propriedades de um e outro componente.

Em conformidade e consenso daquilo que se discute, entende-se que as emulsões podem se classificadas de acordo com a sua estrutura (TADROS *et al.*, 2004). Isso ocorre da seguinte forma :

- **Macroemulsão:** apresentam normalmente uma faixa de tamanho de 0,1-5 mm, com uma média de 1-2 mm;
- **Nanoemulsões:** apresentam geralmente uma gama de tamanhos de 20-100 nm. Semelhante a macroemulsões, eles são apenas cineticamente estáveis;
- **Emulsões micelares ou microemulsões:** estas geralmente têm a faixa de tamanho de 5-50 nm e são termodinamicamente estáveis;
- **Duplas e Múltiplas emulsões:** são as emulsões-de-emulsões, com sistemas A/O/A e O/A/O.
- **Emulsões mistas:** estes sistemas são constituídos por duas gotas diferentes dispersas que não se misturam de uma forma contínua.

2.4.1 Nanoemulsões

Podemos atribuir que uma nanoemulsão, pode ser conceituada e imputada como uma emulsão convencional, desde que nela contenham partículas minúsculas. As nanoemulsões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O). Uma nanoemulsão óleo-em-água é definida como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável, consistindo de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos a ser disperso como pequenas gotas esféricas ($r < 100$ nm) em outro líquido (MCCLEMENTS, 2012).

Daquilo que pertence aos sistemas de entrega coloidais, com base nas nanoemulsões, encontra-se cada vez mais utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas para encapsular, proteger e entregar componentes lipofílicos bioativos (SMITH, 2012). O pequeno tamanho das partículas nestes tipos de sistemas de entrega ($r < 100$ nm) significa que eles têm uma série de vantagens potenciais para certas aplicações: maior estabilidade em longo prazo; alta claridade óptica e aumento da biodisponibilidade (MCCLEMENTS, 2012).

Abaixo estão listadas algumas propriedades das nanoemulsões que a tornam de grande interesse em diversas aplicações:

- Demonstram e apresentam uma grande redução no efeito da força da gravidade e do movimento Browniano. Isto significa que não haverá cremação ou sedimentação durante o armazenamento, o que ocorre frequentemente nas macroemulsões. Chama-se de cremação a separação dos componentes da emulsão baseada na densidade da fase oleosa e aquosa. A cremação é um processo considerado indesejável. A sedimentação ocorre quando as gotículas dispersas se precipitam devido a apresentar uma densidade maior que a fase contínua (SMITH, 2012);
- Procura evitar a floculação, ou seja, permite ao sistema a permanência da dispersão sem que haja separação de fases. A floculação refere-se ao processo em que dois ou mais conjuntos de gotículas comportam-se cineticamente como uma unidade, porém as gotículas individuais conservam a sua identidade (SMITH, 2012);
- Este se reguarda na tentativa de evitar a coalescência uma vez que as gotas não são deformáveis e não existe flutuações na superfície. A coalescência é a colisão e

consequentemente a fusão irreversível de duas gotas e assim sucessivamente onde o fim da coalescência é a completa separação de fases (SMITH, 2012);

- Permite depositar os substratos uniformemente na pele;
- Permite penetração através da superfície da pele ajudando na entrada dos compostos ativos;
- Permite uma rápida penetração dos compostos ativos devido a grande área superficial de contato.

Na Figura 5 estão representados os processos de cremação, sedimentação, floculação e coalescência. Esses processos conduzem a instabilidade de uma emulsão (SANTOS, 2011).

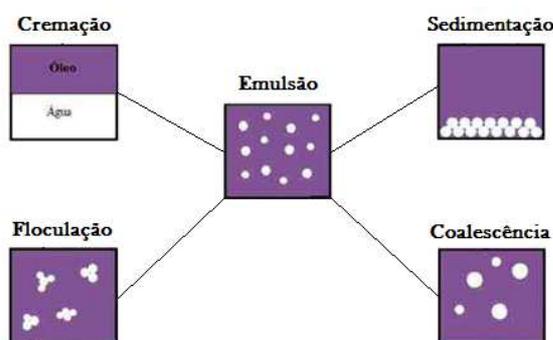


Figura 5. Processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão
Fonte: (SANTOS, 2011)

2.4.1.1 Formação das nanoemulsões

No caso das nanoemulsões, resume-se com base num sistema que não se encontra em equilíbrio termodinâmico, a formação das mesmas requer a aplicação de energia. Esta energia pode ser administrada através de equipamentos mecânicos ou pelo potencial químico inerente dos componentes (SOLANS *et al.*, 2005).

Entretanto, considera-se que a quantidade de energia necessária para a formação das nanoemulsões é variável. Existe uma área de investigação que estuda a formação de nanoemulsões de baixa energia (CANNON, 2000).

2.4.1.2 Diagrama Ternário

O diagrama ternário é método útil quando se estuda a variação de três grandezas. No estudo da formulação da nanoemulsão onde há variações da quantidade de água, em se tratando de óleo e tensoativo, considera-se útil o uso de um diagrama ternário (de fase) para selecionar a relação adequada dos mesmos. Este procedimento proporciona um meio sistemático para aperfeiçoar a formulação de uma emulsão. O diagrama ternário é representado no plano como um triângulo equilátero, onde os três constituintes são simétricos. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos constituintes: óleo, tensoativos e água. O vértice superior representa 100% de tensoativos, o inferior direito, 100% de fase oleosa e o inferior esquerdo, 100% de fase aquosa. Na Figura 6, para determinar as concentrações de cada constituinte no ponto M, deve-se traçar sucessivamente por este ponto as paralelas aos lados opostos aos vértices 100% de cada constituinte (TREGUIER *et al.*, 1975).

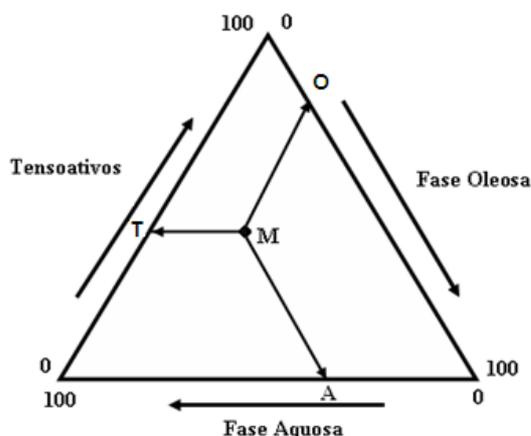


Figura 6. Representação do Diagrama Ternário.

Fonte: (TREGUIER *et al.*, 1975).

2.4.2 Métodos de emulsificação

Portanto, destaca-se a existência de três métodos que podem ser aplicados para a preparação de nanoemulsões. Para que isso ocorra, salientamos a utilização de alta pressão de homogeneização, homogeneização ultrassônica e o método de temperatura de inversão de fases (PIT).

2.4.2.1 Homogeneizadores de alta pressão

Para tanto, os homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados na indústria para a preparação de nanoemulsões (SOLANS *et al.*, 2005). Geralmente trabalham num intervalo de pressão que vai de 50 a 100 MPa. Recentemente tem-se reportado o uso de um instrumento que alcança pressões de 350 MPa. No entanto, as pressões altas não podem ser utilizadas para todo tipo de nanoemulsões, por exemplo, os sistemas O/A que utilizam metilcelulose como um emulsionante só poderá ser estabilizado com um homogeneizador de baixa pressão (150 MPa) pois devido ao forte fluxo de alongação produzido a pressões mais altas promovem a degradação irreversíveis das moléculas de cadeia longa (SOLANS *et al.*, 2005).

2.4.2.2 Emulsificação ultrassônica

Na metodologia e procedimento inseridos na técnica de emulsificação ultrassônica é muito eficiente na redução do tamanho das gotículas, entretanto, para a sua utilização aplica-se de maneira apropriada para lotes pequenos. Um recente ensinamento no modo da preparação de nanoemulsões poliméricas demonstrou que a eficiência do processo de dispersão, depende fortemente do tempo de ultrassonicação a diferentes amplitudes, e, que quanto mais hidrofóbico se encontra o monômero, conseqüentemente, maior será o tempo de sonicação requerido (CANNON, 2000).

O ultrassom pode ser utilizado para muitas aplicações, e, é considerado um método alternativo para produzir uma emulsão. Além da vantagem de um menor consumo de energia o processo por emulsificação ultrassônica inclui a utilização de menos surfactante e a produção de uma emulsão mais homogênea comparando-se com um processo mecânico (CUCHEVAL e CHOW, 2008).

2.4.2.3 Método de temperatura de inversão de fases (PIT)

O método de inversão de fases por temperatura, método PIT introduzido por Shinoda e Saito, (1968) é amplamente usado na indústria. Este método se baseia em formar a emulsão utilizando uma mudança brusca de temperatura. No entanto, seu uso está limitado a sistemas formulados com surfactantes não iônicos do tipo etoxilado, os quais sofrem variações de seu balanço hidrofílico-lipofílico com a temperatura, ou seja, a temperaturas inferiores à temperatura de inversão de fases se formam nanoemulsões óleo-em-água, enquanto que às temperaturas superiores, as mesmas se formam em nanoemulsões água-em-óleo (POLETTO *et al.*, 2010).

2.4.3 Estabilidade das nanoemulsões

Do ponto de vista termodinâmico, em um sistema bifásico, a fase dispersa consiste de gotículas nanoscópicas, usualmente com um intervalo de tamanho menor que 100 nm de diâmetro, tais dispersões nunca são completamente estáveis no sentido absoluto, porque a interface entre as fases é o lugar de energia livre superficial, e se duas gotículas estão juntas há uma redução líquida na área interfacial.

As nanoemulsões são sistemas instáveis devido ao contato entre as moléculas de água e do óleo não serem favoráveis termodinamicamente. Todavia, a variação de energia livre associada com a formação da nanoemulsão determina se uma nanoemulsão é ou não termodinamicamente estável, porém não dar uma indicação da velocidade com que as propriedades de uma nanoemulsão variam através do tempo e nem o tipo de variações que podem ocorrer, ou os mecanismos físicos responsáveis por estas mudanças.

A informação sobre a dependência do tempo na estabilidade de nanoemulsões é um dado particularmente importante para as pesquisas em alimentos, fármacos e cosméticos, pois necessitam criar produtos que retenham suas propriedades desejáveis por um tempo suficientemente longo sob uma variedade de diferentes condições ambientais. Por esta razão, os investigadores se interessam mais na estabilidade cinética das nanoemulsões do que em sua estabilidade termodinâmica (MCCLEMENTS, 2012).

A importância dos efeitos cinéticos se destaca ao comparar a estabilidade em longo prazo das emulsões com a mesma composição, porém com diferentes tamanhos de gota. Uma emulsão que contem gotas pequenas usualmente tem uma maior vida de prateleira (maior estabilidade cinética) que uma que contenha gotas grandes, ainda que seja mais instável termodinamicamente (porque tem uma área interfacial maior) (MCCLEMENTS, 2012).

Apesar do fato das nanoemulsões existirem em um estado termodinamicamente instável, as mesmas permanecem cineticamente estáveis (metaestáveis) por meses ou inclusive anos (TADROS *et al.*, 2004).

Conceitualmente, a estabilidade cinética de uma nanoemulsão pode ser atribuída a presença de uma barreira energética entre dois níveis energéticos, isto é, uma energia de ativação, a qual deve ser superada antes que se alcance o estado termodinamicamente mais favorável. Uma nanoemulsão que é cineticamente estável deve ter uma energia de ativação significativamente maior que a energia térmica do sistema. Na realidade, as nanoemulsões apresentam um número diferente de estados metaestáveis, e cada um deles tem sua própria energia de ativação. Assim, uma nanoemulsão pode mover-se de um estado metaestável a outro antes de alcançar sua estabilidade termodinâmica.

Uma nanoemulsão cineticamente estável (metaestável) é aquela na qual não se apresentam alterações significativas na distribuição do tamanho das gotas, em seu estado de agregação, ou em seu arranjo espacial na escala do tempo de observação. Esta escala de tempo pode variar de meses a anos dependendo da situação (DICKINSON, 2003).

A estabilidade cinética é um parâmetro muito importante nas nanoemulsões pensadas para uso comercial, especialmente as elaboradas para liberação de fármacos. Algumas das variáveis importantes a ser monitoradas são: tamanho da gota, viscosidade, potencial zeta e pH (CANNON, 2000).

2.4.3.1 Fatores de estabilidade das nanoemulsões

O tamanho pequeno das gotículas das nanoemulsões confere estabilidade contra a sedimentação (o cremação) porque o movimento browniano, e, conseqüentemente a velocidade

de difusão são mais altos que a velocidade de sedimentação induzida pela força da gravidade (SOLANS *et al.*, 2005).

Entretanto, o único problema de instabilidade das nanoemulsões é o fenômeno de maturação de Ostwald ou difusão molecular (TADROS *et al.*, 2004).

2.4.3.2 Fenômeno de maturação de Ostwald

O fenômeno de maturação de Ostwald destaca-se o processo pelo qual as gotas grandes crescem à custa das menores pelo transporte de massa da fase dispersa de uma gota para a outra através da fase contínua intermediária (MCCLEMENTS, 2012).

No caso das nanoemulsões polidispersas e a diferença na solubilidade entre as gotas pequenas e as grandes, considera-se o principal mecanismo de desestabilização das nanoemulsões (TADROS *et al.*, 2004).

A existência de alguma difusão presente no conteúdo da fase dispersa, o tamanho das gotas grande aumentará às custas das pequenas e a média da distribuição de tamanho aumentará continuamente. Este efeito fora inicialmente descrito a fim de elucidar tais eventos que poderiam vir a acontecer (LIFSHITZ e SLYOZOV, 1961). E de maneira independente, o mesmo efeito fora esclarecido e explanado sob um aspecto mais amplo, numa ordem cronológica posterior (WELIN-BERGER e BERGENSTÅHL, 2000).

Ao longo dos anos, levantaram-se várias ideologias, porém, uma sugeriu que a adição de um componente secundário menos solúvel em água pode diminuir o fenômeno de maturação de Ostwald. A difusão mais lenta do componente secundário levará a uma distribuição heterogênea com as gotas menores enriquecidas no componente menos solúvel e as gotas maiores enriquecidas no componente mais solúvel (WELIN-BERGER e BERGENSTÅHL, 2000).

Apesar disso, esta segregação interna será oposta termodinamicamente a pressão osmótica e atuará para limitar as diferenças entre as gotas e posteriormente se alcançará o equilíbrio. Este princípio tem sido aplicado com sucesso com hidrocarbonetos e em emulsões com fluoretos de carbono (WELIN-BERGER e BERGENSTÅHL, 2000).

- Mostrar capacidade para emulsificar o sistema requerido com pequenas concentrações de emulsificante (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET e L'ALLORET, 2004);
- Deve ser relativamente econômico, deve ser seguro e não tóxico (TADROS *et al.*, 2004);

Os mecanismos de instabilidade em uma nanoemulsão são influenciados pela concentração dos emulsificantes nas fases aquosas, e em maior grau, pela concentração do emulsificante lipossolúvel, a natureza e viscosidade da fase oleosa, a natureza e concentração dos ingredientes encapsulados na fase aquosa interna, assim como a adsorção de moléculas nas interfaces (WEN e PAPADOPOULOS, 2001).

Um fator importante no desenvolvimento de nanoemulsões é o tipo de emulsificante, os mais comuns são conhecidos como tensoativos (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Existem diferentes tipos de tensoativos que podem ser aniônicos, catiônicos e não iônicos. Os tensoativos não iônicos não produzem íons em solução aquosa e por esta razão são compatíveis com qualquer outro tipo, e por isso são excelentes candidatos para formulações complexas que muitas vezes entram em aplicações práticas (SCHRÖDER e SCHUBERT, 1999).

Os tensoativos desempenham duas funções importantes na formação da nanoemulsão, pois reduz a tensão superficial entre o óleo e a água facilitando a distribuição das gotículas e estabiliza as gotículas contra a coalescência e/ou agregação (SCHRÖDER e SCHUBERT, 1999).

Para a elaboração de nanoemulsões é importante mencionar que os tensoativos devem ser capazes de formar gotas com um diâmetro menor que 100nm, e apresentar as seguintes características: o diâmetro da parte polar (cabeça) do tensoativo deve ser duas vezes menor que o comprimento da cadeia carbônica e devem ter um EHL entre 8 e 17 (TADROS *et al.*, 2004).

2.4.5 Equilíbrio hidrofílico – lipofílico (EHL)

O tensoativo deve ser equilibrado em termos de ter a quantidade certa de grupos solúveis em água e solúveis em óleo que se concentram na interface e, portanto, diminuem a tensão superficial. Por conseguinte, o tensoativo deve conter uma parte hidrofílica e outra lipofílica de forma equilibrada, de modo que quando inicialmente disperso na fase oleosa ou a fase aquosa,

migre para a interface e se oriente com o grupo hidrofílico na água e o grupo lipofílico na fase oleosa. Logo, surgiu a necessidade do desenvolvimento de uma escala arbitrária de valores que servem como uma medida de equilíbrio hidrófilo lipofílico (EHL) dos agentes superficialmente ativos. Assim, através deste sistema numérico de índice EHL pode-se definir um intervalo de máxima eficiência para cada espécie ou classe de tensoativos. Nessa escala, quanto maior o EHL de um agente mais hidrofílico ele será (PARKINSON, 1985).

A Tabela 2 apresenta a classificação dos agentes emulsificantes que correspondem com seu EHL (GRIFFIN, 1946).

Tabela 1: Classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL

| Faixa de EHL | Aplicação |
|---------------------|--------------------|
| 4-6 | Emulsificante A/O |
| 7-9 | Umectantes |
| 8-18 | Emulsificantes O/A |
| 13-15 | Detergentes |
| 10-18 | Solubilizantes |

3 Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar físico-quimicamente, espectroscopicamente e cromatograficamente o óleo essencial de folhas da espécie *Copaifera multijuga* Hayne; submetendo-o a ensaios biológicos, farmacológicos e desenvolver abordagem nanobiotecnológica mediante nanoemulsão, elucidando seus princípios bioativos e conferindo a essa espécie seu uso sustentável.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o rendimento médio do OE de CMH extraído por hidrodestilação;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas (pH e índice de refração) e espectroscópicas (UV – Vis e FTIR) do OE_{CMH};
- Quantificar os componentes e metabólitos do OE_{CMH}, por meio do CG/MS;
- Obter a nanoemulsão mais estável do OE_{CMH_n};
- Estudar a viabilidade farmacológica *in vitro*, observando o efeito microbiológico e a atividade citotóxica do OE_{CMH};
- Verificar a exequibilidade farmacológica *in vitro*, o desempenho das aplicações biológicas quanto a ação citotóxica do OE_{CMH_n};
- Elucidar a atividade bactericida do óleo essencial e do sistema nanoemulsionado da CMH *in vivo* da espécie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;

4 MATÉRIAS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Balança eletrônica

Para auxiliar a verificação do processo de pesagem das folhas frescas e secas de *Copaifera multijuga* Hayne, foi utilizada uma balança eletrônica portátil marca Ohaus, modelo CS 2000 Compact Scale, com visor de cristal líquido, carga máxima de 2000 g, sensibilidade de 1 g, reprodutibilidade 1g, campo de tara: a capacidade mediante subtração, tempo de estabilização ≤ 3 s.

4.1.2 Estufa Microprocessada de Secagem

Para o processo de secagem das folhas foi utilizada uma estufa microprocessada de secagem da marca Quimis, modelo Q317M, a temperatura e tempo controlado, com duas bandejas de tela de aço inoxidável.

4.1.3 Processador

Para trituração e processamento das folhas, após secagem em estufa foi utilizado um Processador da marca Mondial, modelo Power 2i, com duas velocidades, função pulsar e copo em PP iquebrável.

4.1.4 Hidrodestilador

Para auxiliar na obtenção do Óleo Essencial (OE) de *Copaifera multijuga* Hayne foi utilizado um aparelho tipo Clevenger modificado, junto com um balão de fundo redondo de 5.000 mL, uma manta aquecedora e um sistema de refrigeração (Figura 8).



Figura 8. Hidrodestilador
Foto – Thiago César Moreira

4.1.5 Balança eletrônica de precisão

Para a pesagem dos materiais no preparo da nanoemulsão foi utilizada uma balança eletrônica de precisão da marca Shimadzu, modelo AY220 (Figura 9).



Figura 9: Balança eletrônica de precisão
Foto – Thiago César Moreira

4.1.6 Destilador de água

A obtenção de água destilada para uso na hidrodestilação do óleo essencial e para a preparação das nanoemulsões foi realizada pelo destilador de água tipo Pilsen da marca Quimis, modelo Q341.

4.2 Métodos

4.2.1 Coletas das folhas

As folhas da espécie *Copaifera multijuga* Hayne (CMH) foram coletadas na rodovia AC – 010, Estrada de Porto Acre no km 18, com as seguintes coordenadas: 9° 45' 16,7" S latitude e 67° 39' 48,5" W longitude, Rio Branco, Acre. A coleta das folhas foi realizada no período do mês de janeiro (**Figura 10**). A amostra coletada foi depositada no herbário da UFAC, e sua exsiccata realizada pelo laboratório de Botânica da UFAC, cujo número do tombo da CMH é de 6572. O clima da região de cultivo é quente e úmido, caracterizado por pluviosidade em torno de 2.937 mm anuais, umidade relativa média de 89 % e temperatura média anual de 27.8 °C.

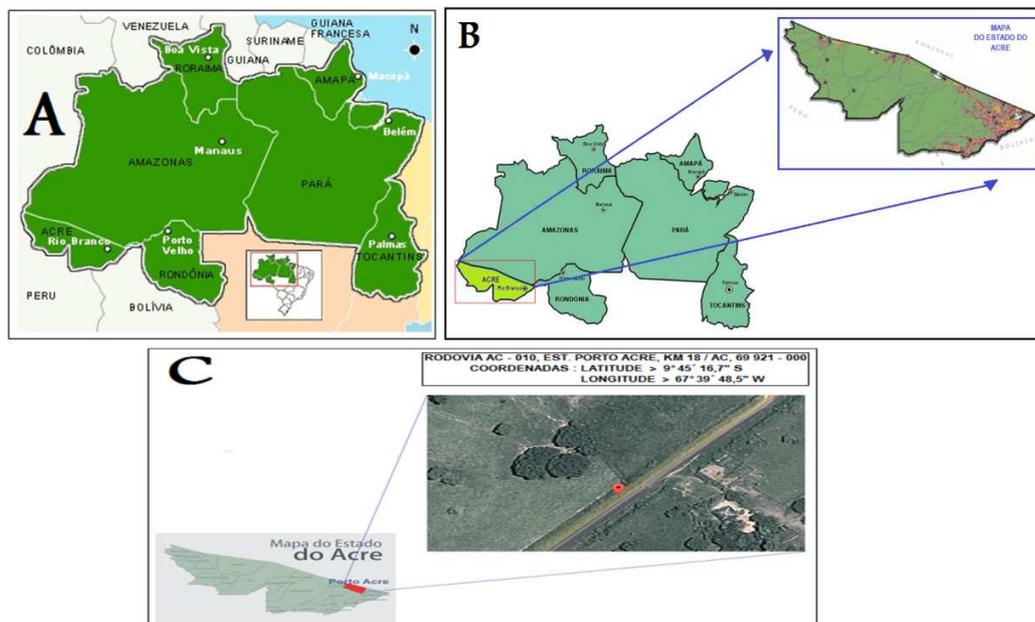


Figura 10. Área de coleta das folhas de *Copaifera multijuga* Hayne
Imagem – Thiago César Moreira

4.2.2 Seleção do material botânico

As folhas de *Copaifera multijuga* Hayne foram selecionadas e lavadas, de modo que, foram retiradas as folhas adultas, as partes danificadas e a poeira, após esse processo, realiza-se a coleta apenas das folhas jovens, e, em seguida é colocada na estufa à temperatura de 50 °C até a secagem uniforme (SANTOS, 2014).

4.2.3 Extração do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

As folhas secas de *Copaifera multijuga* Hayne finamente trituradas, foram hidrodestilada durante 4 horas com o uso de aparelho tipo Clevenger modificado, instalado no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC. Utilizaram-se para cada extração 4,0 litros de água destilada e 300 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo redondo de 5.000 mL. No final da extração foi feita a aferição do volume do OE no mesmo aparelho clevenger (Figura 11), para em seguida ser armazenado em vidro âmbar com tampa e colocado em refrigerador à temperatura inferior a 5°C para posterior análise.



Figura 11. Extração do óleo essencial das folhas de *Copaifera multijuga* Hayne
Imagem – Thiago César Moreira

4.2.4 Caracterização físico-química do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

4.2.4.1 Índice de Refração

O índice de refração do OE de CMH foi determinado com a utilização de um refratômetro de bancada Abbé da marca Nova Instruments, modelo NOVA WYA-2S.

Para a realização da medida do índice de refração, o aparelho foi calibrado e ajustado com água destilada. Após o ajuste, foram colocadas três gotas da amostra entre os prismas, realizando-se a leitura na escala, obtendo-se o índice de refração absoluto.

4.2.4.2 Medida do pH

Para a obtenção do pH exato do óleo essencial da CMH, utilizou-se o equipamento pHmetro Microprocessado de Bancada 110V / 220V 10W, modelo Q 400 MT, da marca Quimis.

4.2.5 Caracterização Espectroscópica

4.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

A análise do espectro de absorbância UV-VIS do óleo essencial foi realizada no equipamento Shimadzu UV – 1601PC UV - Visível, com varreduras nos comprimentos de onda entre 190 a 1100 nm, para concentrações de 0,05 %, 0,10 %, 0,25 %, 0,5 % e 2,0 % do OECMH diluído no solvente com volume total de 2 mL. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 nm, e, hexano como solvente. Antes de iniciar a realização das medições, adotou-se a conduta de calibração do equipamento, com a curva padrão do solvente utilizado, considerando que para as análises das amostras, as corridas foram de 200 até 1100 nm. Seguidamente, começou-se a realizar as medições do espectro, e, posterior verificação do gráfico para cada valor obtido.

4.2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT – IR)

Os espectros de FT – IR, foram obtidos no modo de transmissão em um espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS 50 FT – IR. A amostra do OECMH foi colocada a modo de preencher completamente o espaço onde tem um prisma de cristal como acessório e foi realizada a medição trabalhando na faixa do espectro de luz Infravermelho médio entre 10 cm^{-1} até 25000 cm^{-1} . Além disso, realizou-se uma medida de referência, onde o prisma de cristal (ZnSe) estava vazio, para servir de referência, comumente conhecido como “background”, esta medida será considerada na hora do apresentar o espectro.

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho por absorbância foi usada para caracterizar a amostra do OECMH, auxiliando na análise dos possíveis grupos funcionais químicos presentes na amostra do mesmo, como também, evidenciar a existência dos

componentes e na proposição de suas possíveis estruturas moleculares que são detectadas no espectro infravermelho.

4.2.6 Análise Cromatográfica

4.2.6.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG – MS)

A análise caracterizada como cromatografia gasosa acoplada à massa do OECMH foi realizada no Laboratório da Polícia Federal do Acre, utilizando-se o trabalho realizado por (ALMEIDA, 2009) como parâmetro, a análise cromatográfica gasosa (CG) ocorreu num cromatógrafo a gás Agilent Modelo 7890 A equipado com uma coluna capilar HP – 5 MS de 30 m, 0,25 mm D.I., e filme de 0,25 μm . A temperatura de forno foi mantida a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, em seguida foi elevada a 180 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 4 $^{\circ}\text{C} / \text{min}$, sendo novamente elevada a 250 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C} / \text{min}$. Utilizou-se hélio como gás transportador, velocidade de fluxo 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e modo de divisão. A composição percentual de cada componente foi calculada pela integração das áreas dos picos do cromatograma. Posteriormente, a análise da cromatograma gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG – MS) foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent Modelo 7890 A em interface com um detector seletivo de massa Agilent Modelo 5975 C. Utilizou-se hélio como gás transportador. As condições operacionais do detector foram: tensão de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de íons de 230 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de massas foram gravados a partir de 40 – 550 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa onde o espectro é comparado em biblioteca fornecida com o equipamento (Mass Spectral Libraries Ver D. 05.00) e mantida atualizada pelo Departamento da Polícia Federal. O CG foi equipado com uma coluna capilar HP – 5 MS de 30 m, 0,25 mm D.I., e um filme de 0,25 μm . Os parâmetros operacionais do CG foram os mesmos descritos acima.



Figura 12. Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massa (CG – MS)
Foto – Thiago César Moreira

4.2.7 Desenvolvimento da nanoemulsão

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos - UFAC, utilizando-se o método de sonicação por alta energia (ABBAS *et al.*, 2013). Como fase aquosa usou-se água destilada, como fase oleosa utilizou-se OE da CMH, e como tensoativo foram usados Polissorbato 80 e Oleato de Sorbitano 80 com especificações apresentada na Tabela 2.

Primeiro foi realizada uma pre-emulsão dissolvendo-se o tensoativo na fase aquosa para depois ser misturado na fase oleosa. A solução foi colocada dentro do equipamento sonificador de marca Sonoplus Bandelin UW 2070. Manteve-se contato direto da ponta do aparelho com a solução, e foi utilizado uma potencia de 60 watts para 4 ciclos de processamento de 5 minutos (Figura 13), refrigerando o sistema com um banho de gelo para reduzir o aquecimento e desta forma evitar alterações nos resultados (SOLANS *et al.*, 2005).

Tabela 2: Características dos tensoativos utilizados nas formulações

| Nome | INCI | Nome Comercial | EHL | Fabricante | Características |
|------------------------|---------------------|----------------|------|-------------------|---------------------------|
| Polissorbato 80 | Polyssorbate 80 | Tween® 80 | 15,0 | POLYTECHNO | Hidrofílico Não ionico |
| Oleato de Sorbitano 80 | Sorbitan monooleate | Span® 80 | 4,3 | SABÃO E GLICERINA | Lipofílico Não ionico |



Figura 13. Sonicador
Foto – Thiago César Moreira

4.2.7.1 Determinação do tamanho das partículas na nanoemulsão.

O tamanho médio das partículas e a distribuição do tamanho, medida pelo índice de polidispersão (IP) das nanodispersões são parâmetros muito importantes na área de nanotecnologia farmacêutica. O tamanho determina em muitos casos a distribuição das partículas *in vivo*. O tamanho das nanopartículas depende de vários fatores: método de preparação, natureza do material utilizado, peso molecular e concentração do polímero utilizado, características físico-químicas do fármaco encapsulado, concentração de tensoativos, proporção entre fase oleosa e aquosa, a viscosidade das fases utilizadas, a velocidade de agitação e também a velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa em alguns métodos (ARAÚJO, 2009). Quanto à estabilidade,

o tamanho das nanopartículas é importante, pois pode evidenciar a tendência destes sistemas à agregação ao longo do tempo. A espectroscopia de correlação de fótons (ECF) é considerada o método padrão para a determinação do diâmetro médio e da distribuição do tamanho (IP). Esta técnica baseia-se na análise do movimento das partículas na água que é inversamente proporcional ao seu tamanho, podendo ser detectado pela correlação do tempo das flutuações de intensidade da luz espalhada quando as nanopartículas são iluminadas por um feixe de laser (ARAÚJO, 2009). Estas flutuações na intensidade da luz espalhada são relacionadas à velocidade de difusão das partículas para dentro e para fora da região que está sendo estudada, e os dados podem ser analisados para fornecer coeficientes de difusão das partículas que fazem o espalhamento. Assim, a partir dos coeficientes de difusão, os dados são processados para fornecer o tamanho da partícula considerada esférica (ARAÚJO, 2009).

4.2.7.2 Determinação do EHL requerido do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne.

Para o estudo do EHL do óleo, utilizou-se um tensoativo hidrofílico e outro lipofílico. A determinação do EHL requerido do OE de CMH foi realizada a partir de valores de EHL de 8,0 até 15,0 (Tabela 2). Para o cálculo das quantidades dos tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para o preparo das emulsões em cada valor de EHL foi empregado o método citado por Griffin (1949) utilizando-se do sistema de equações abaixo:

$$\frac{M_A \text{ EHL}_A + M_B \text{ EHL}_B}{M_A + M_B} = \text{EHL}_{\text{Final}} \quad (2)$$

$$M_A + M_B = 10 \text{ g}$$

Em que:

M_A = massa de tensoativo hidrofílico;

M_B = massa de tensoativo lipofílico;

EHL_A = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

EHL_{Final} = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Final.

Os valores das massas para as formulações dos tensoativos com EHL variando de 8,0 a 15,0 e massa total de 10,0 g estão na Tabela 3.

Tabela 3: Massas dos tensoativos para formulações de diferentes EHL

| HLB Final | HLB Tween 80 | Massa (g) Tween 80 | HLB Span 80 | Massa (g) Span 80 | Massa total (g) |
|-----------|--------------|--------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| 8,0 | 15 | 3,48 | 4,3 | 6,57 | 10,0 |
| 9,0 | 15 | 4,42 | 4,3 | 5,62 | 10,0 |
| 10,0 | 15 | 5,34 | 4,3 | 4,68 | 10,0 |
| 11,0 | 15 | 6,27 | 4,3 | 3,74 | 10,0 |
| 12,0 | 15 | 7,22 | 4,3 | 2,81 | 10,0 |
| 13,0 | 15 | 8,14 | 4,3 | 1,87 | 10,0 |
| 14,0 | 15 | 9,10 | 4,3 | 0,90 | 10,0 |
| 15,0 | 15 | 10,00 | 4,3 | 0,00 | 10,0 |

As quantidades totais dos componentes da emulsão - água, óleo e tensoativos, utilizadas nas formulações, estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Composição das formulações para estudo do EHL – 10% de tensoativo

| Formulação | EHL | Água (%) | Massa da água (g) | Tensoativo (%) | Massa do tensoativo (g) | Óleo (%) | Massa do Óleo (g) | Massa Total (g) |
|------------|------|----------|-------------------|----------------|-------------------------|----------|-------------------|-----------------|
| 1 | 8,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 2 | 9,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 3 | 10,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 4 | 11,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 5 | 12,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 6 | 13,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 7 | 14,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |
| 8 | 15,0 | 85 | 4,25 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 | 5,0 |

Para determinação do valor de EHL do OE de CMH, tomou-se como referência a emulsão que apresentar maior estabilidade após ser submetida ao teste de centrifugação (MORAIS, 2006), assim como os valores do potencial zeta, do tamanho e da distribuição dos glóbulos.

4.2.7.3 Equacionamento do Diagrama Ternário da nanoemulsão mais estável para o EO da CMH

Foi construído o diagrama ternário para a formulação de tensoativo no valor de EHL resultante para a formação de nanoemulsão (Figura 14).

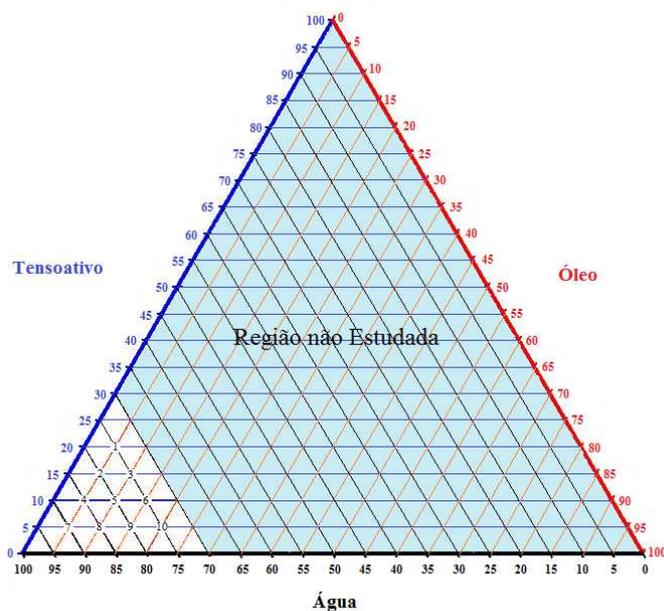


Figura 14. Diagrama ternário do OE de CMH, tensoativo e água

As quantidades de cada componente do diagrama para as respectivas formulações encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 5: Quantidade de água, tensoativos e óleo das formulações contidas no diagrama ternário

| Formulação | Água (%) | Massa de água (g) | Tensoativo (%) | Massa de tensoativo (g) | Óleo (%) | Massa de Óleo (g) | Massa Total (g) |
|------------|----------|-------------------|----------------|-------------------------|----------|-------------------|-----------------|
| 1 | 80 | 4,00 | 15 | 0,75 | 5 | 0,25 | 5,00 |

| | | | | | | | |
|---|----|------|----|------|----|------|------|
| 2 | 75 | 3,75 | 15 | 0,75 | 10 | 0,50 | 5,00 |
| 3 | 70 | 3,50 | 15 | 0,75 | 15 | 0,75 | 5,00 |
| 4 | 85 | 4,25 | 10 | 0,50 | 5 | 0,25 | 5,00 |
| 5 | 80 | 4,00 | 10 | 0,50 | 10 | 0,50 | 5,00 |
| 6 | 75 | 3,75 | 10 | 0,50 | 15 | 0,75 | 5,00 |
| 7 | 90 | 4,50 | 5 | 0,25 | 5 | 0,25 | 5,00 |
| 8 | 85 | 4,25 | 5 | 0,25 | 10 | 0,50 | 5,00 |
| 9 | 75 | 3,75 | 5 | 0,25 | 15 | 0,75 | 5,00 |

4.2.7.4 Avaliações da estabilidade da nanoemulsão

A estabilidade da preparação preliminar nanoemulsão foi avaliada às 24 horas por centrifugação. A estabilidade foi determinada por inspeção emulsão de observação e análise do tamanho de gotícula. O objetivo destes ensaios foi o de achar e selecionar a formulação mais estável, contendo a concentração de surfactante adequada com uma nanoemulsão de gotículas de tamanho e propriedades físico-químicas estáveis. Os testes foram realizados com 10, 20, 30, e 40 dias após a preparação. As medições de análise foram o tamanho das gotas, o valor de pH e condutividade elétrica. A nanoemulsão produzida foi caracterizada utilizando o analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nano ZS do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – FIOCRUZ / RONDÔNIA, a fim de se obter a distribuição do tamanho das gotas dispersas na nanoemulsão, com capacidade de realizar a varredura das partículas, bem como a sua distribuição de tamanho e dispersão que estiver entre 0,2 nm a 10 μm , no qual foram submetidas à caracterização dos diâmetros, através do método de espalhamento de luz.

O potencial Zeta representa o residual de cargas negativas na superfície das nanoemulsões. As amostras foram medidas através de dispersão de luz eletroforética. As amostras foram adicionadas à cubeta contendo os eletrodos com capacidade para aproximadamente 1 mL. As medidas foram realizadas com amostras na diluição de 1:10 (100 μL da formulação e 900 μL de água), utilizando água bi-destilada, como meio de dispersão, a 25°C.

4.2.8 Teste de atividade biológica

4.2.8.1 Teste da viabilidade celular das nanoemulsões em macrófagos

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio). Neste método, o MTT é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO (dimethylsulfoxide). Os macrófagos da linha J774 células foram plaqueados a $2,5 \cdot 10^5$ células/poço em placas de 96 poços e incubado por 24 horas em estufa 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação a placa foi adicionado 20µl das formulações (2% por poço das formulações), e o DMSO como controle de referência. Após ser incubado por 24, horas foi adicionada 10 µL de solução de MTT 5 mg/ml. Após o MTT foi colocada novamente na estufa 37°C, 5% de CO₂, por 4 horas de incubação, decorrido o tempo foi adicionado 150µl de (dimethylsulfoxide) DMSO. Após 1 hora, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os cálculos foram determinados utilizando-se fórmula: $1 - (D.O. amostra / D.O. contole) \times 100$. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade.

Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (PEREIRA, 2010).

O teste de viabilidade celular foi realizado o OECMH e com as nanoemulsões que foram produzidas a partir o óleo essencial extraído do das folhas da CMH em macrófagos retirados do peritônio de camundongos linha J774, para verificar a citotoxicidade dessas nanoemulsões.

4.2.9 Teste de atividade microbiológica

A sensibilidade da linhagem microbiana frente ao óleo essencial da *Copaifera multijuga* Hayne e das nanoemulsões mais estáveis, foi determinada de acordo com as normas instituídas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), através da metodologia de difusão de disco aplicado em Ágar enriquecido com nutrientes que favorecem o crescimento bacteriano, utilizando o emprego de concentrações inibitórias mínimas, do óleo essencial da CMH e das nanoemulsões, correlacionando com a sensibilidade das bactérias avaliadas. O valor aplicado de OEMH e das nanoemulsões, foi de 20 µL no papel esférico de alta absorção, e, posteriormente aplicado na placa de Petri contendo Ágar Müeller Hinton (AMH) como meio de cultura mais utilizado e viável para a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos ou antibiograma, contendo a semeadura da bactéria identificada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SILVA *et al.*, 2009). Após incubação a 35°C por 24 horas, os valores de CIM foram considerados aqueles cuja formação de colônias de crescimento foi alterada negativamente, esse experimento foi realizado em triplicata. Posteriormente, a leitura da CIM foi verificada através da observação da presença ou ausência do crescimento bacteriano para a linhagem bacteriana escolhida, aferindo o diâmetro do halo de inibição, através do halômetro, e assim, estabelecendo da melhor forma o valor da CIM do microorganismo escolhido para a avaliação (PROBST, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

O rendimento médio do OE de CMH extraído por hidrodestilação foi de 0,538% (Tabela 5). Esse valor representa que para 300 gramas de folhas secas de CMH, foram obtidos uma média de 1,62 ml de OE por meio de hidrodestilação.

Tabela 6: Rendimento do OE da CMH

| Extração | Massa (g) | Volume (ml) | Rendimento (% ou ml/300g) |
|-------------------------|-----------|-------------|---------------------------|
| 1 | 300 | 1,5 | 0,50 |
| 2 | 300 | 1,7 | 0,56 |
| 3 | 300 | 1,8 | 0,60 |
| 4 | 300 | 1,6 | 0,53 |
| 5 | 300 | 1,5 | 0,50 |
| Rendimento Médio | | | 0,538 |

O rendimento do OE de CMH encontrado neste trabalho apresentou valor similar a outro trabalho realizado, mesmo que este seja desenvolvido em condições diferentes. Na Tabela 6 encontram-se os valores do rendimento do OE de CMH calculado a partir da biomassa seca reportados em outros trabalhos.

Tabela 7: Rendimento do OE de CMH reportado na literatura.

| Rendimento (%) | Referência |
|----------------|-----------------|
| 0,65 | (ALMEIDA, 2009) |

A partir da análise da Tabela 6 e do valor do rendimento do OE de CMH encontrado neste trabalho, percebemos que o rendimento médio apresenta variações de acordo com a localidade

onde a planta foi coletada, destacando se ela pertence à mata virgem na natureza, ou se ela pertence a um plantio de manejo controlado, conforme o destacado na tabela 6.

5.2 Caracterização físico – química do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

5.2.1 Índice de Refração

O índice de refração medido para o OE de CMH foi de 1,5045 a 20,0 °C. A refração dos óleos serve para aferir as refringências de um óleo, assim de acordo com sua natureza, os óleos podem desviar com maior ou menor intensidade os raios luminosos que os atravessam. O índice de refração também está associado ao tamanho da cadeia hidrocarbonada, onde, quanto maior o índice maior será a cadeia hidrocarbonada e maior o grau de insaturação do óleo em análise. Por se tratar de uma constante para o óleo, este índice é útil na identificação da substância, como também na detecção da presença de impurezas (BERNAL *et al.*, 2011).

5.2.2 Medida do pH

O pH observado no equipamento para a análise do OE de CMH, apresentou um valor ácido (pH = 4,58), o valor encontrado é uma característica que chama a atenção, necessitando de uma possível correção no seu pH, garantindo assim, que as aplicações e realizações de testes *in vivo*, possa haver biocompatibilidade.

5.3 Caracterização espectroscópica do Óleo Essencial de *Copaifera multijuga* Hayne

5.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta

Na região do ultravioleta, as absorções ocorrem por meio de transições eletrônicas, características para cada tipo de grupo cromóforo. Entretanto, ressalto que o UV foi utilizado neste trabalho como uma ferramenta qualitativa, na tentativa de se encontrar, através das absorções de cromóforos, a indicação da presença de saturações ou insaturações, por exemplo. A figura 15 apresenta os espectros de absorção no UV para os óleos essenciais em hexano. Entre os melhores resultados observados na análise do UV, destaca-se a concentração de 0,05 % do OE da CMH, diluído em 2 mL do solvente. Nossa amostra composta de OE da CMH tem majoritariamente entre seus componentes, os terpenos (apresentando fórmula estrutural $C_{5}H_{8n}$), alguns deles apresentam baixa absorbância no espectro UV – VIS para a concentração de 0,05 % para um comprimento de onda de 251 até 256 nm, para as outras concentrações a absorbância da amostra apresentou valor nulo.

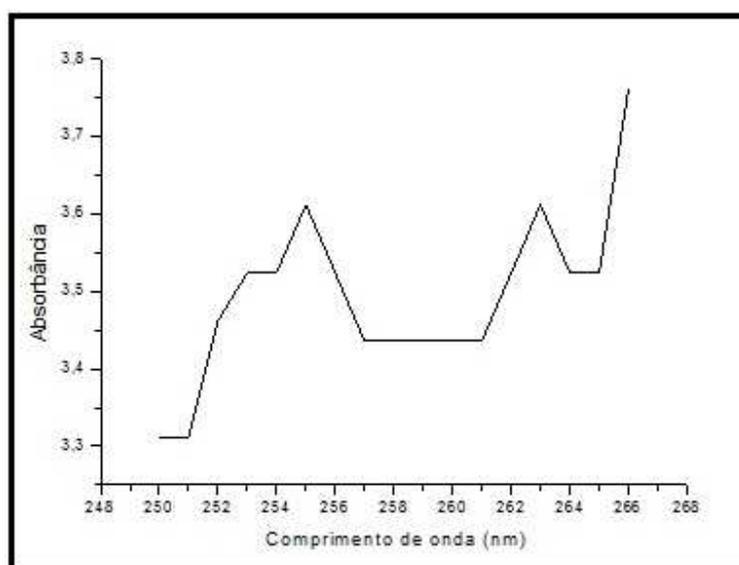


Figura 15. Espectro da absorbância do UV-VIS para o OE da CMH.

Na Figura 15, nota-se que no espectro UV do OE da CMH, a presença de uma banda de absorção se inicia na faixa que vai aproximadamente de 251 até 256 nm, caracterizando – se esse tipo de moléculas, se destacam-se os hidrocarbonetos denominados alcanos, que contêm apenas ligações simples e não possuem átomos com pares de elétrons não compartilhados, as únicas

transições eletrônicas possíveis são do tipo $\sigma - \sigma^*$. Essas transições são de uma energia tão alta que eles absorvem a energia ultravioleta em comprimentos de onda muito curtos (mais curto do que os comprimentos de onda que são experimentalmente acessível usando especificação típica de espectrofotometria).

Uma única banda de baixa intensidade na região de absorção UV na faixa de 261 – 264 nm, sem grande absorção em comprimentos de onda mais curtos, geralmente indica uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, evidenciando a presença de compostos com características dos alcenos e dienos conjugados, os quais se direcionam para os alcadienos e benzenos. Levando-se em consideração que a absorção pode não acontecer nos comprimentos de onda longo, simples, ou não conjugado, indicando assim, a presença de um cromóforo, ou grupos covalentes insaturados (LOPES e FASCIO, 2004).

5.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O presente trabalho representa uma contribuição com o objetivo de facilitar a tarefa de análise e interpretação de espectros de infravermelho, estabelecendo um caminho objetivo e prático que permite a identificação dos principais grupamentos funcionais e a proposição de uma possível estrutura (ou estruturas) para as substâncias orgânicas mais simples. O instrumento da espectroscopia no infravermelho pela transformada de Fourier confere alta velocidade de análise, alta resolução espectral, alta sensibilidade, excelente precisão e exatidão em relação ao comprimento de onda de interesse. A figura 16 apresenta os espectros da absorvância do infravermelho, obtidos para o OE da CMH.

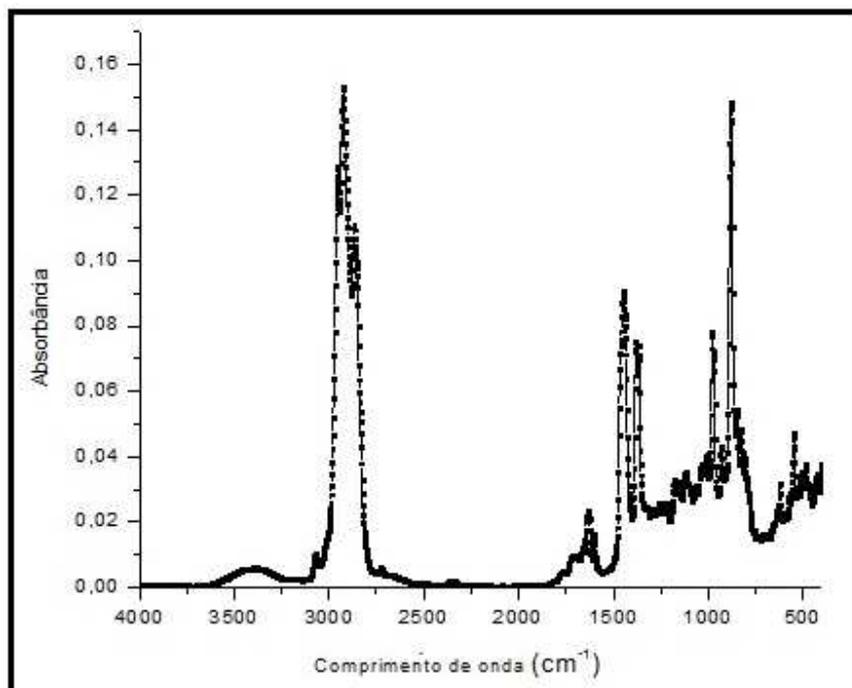


Figura 16. Espectro da absorvância do FT – IR para do OE da CMH.

Inicialmente, observa-se que no espectro de absorvância FT – IR do OE da CMH, o 1^o pico identificado com o comprimento de onda em 2918 cm^{-1} , refere-se a um estiramento na ligação C – C, com características funcionais de alcanos. Nos 2^o e 3^o picos identificados com os comprimentos de onda em 1444 e 1380 cm^{-1} respectivamente, refere – se há uma deformação na cadeia de hidrocarbonetos na forma assimétrica e simétrica, ambas em – CH₃. Nos 4^o e 5^o picos identificados com os comprimentos de onda em 979 e 883 cm^{-1} respectivamente, refere – se há uma deformação média que se atribui a ligação C = C – H , presentes nos alcenos conjugados, anéis aromáticos, e, hidrocarbonetos alifáticos, denominados olefinas.

Sendo assim, o conjunto dessas observações e fatores associados, levam a predição de compostos químicos constituído unicamente por átomos de carbono e de hidrogênio unidos tetraedricamente por ligação covalente assim como todos os compostos orgânicos, havendo a ocorrência de saturações e insaturações.

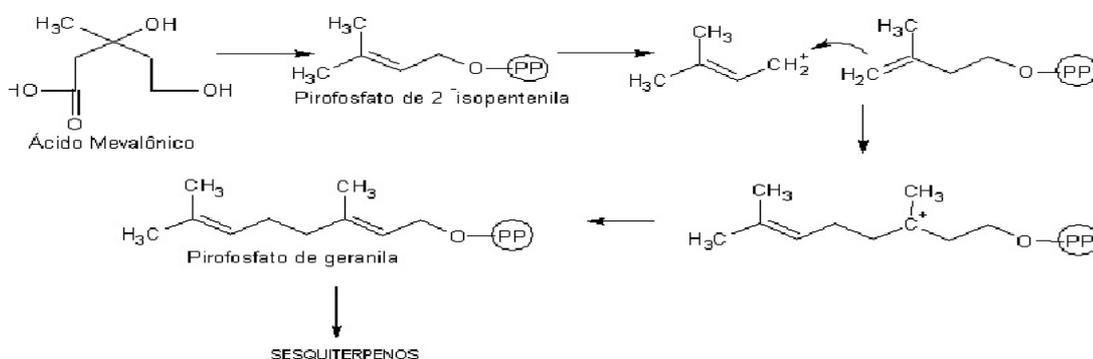
Tabela 8: Bandas de absorção para os picos encontrados no OE da CMH

| Número de onda (cm ⁻¹) | Atribuições |
|---|--|
| 1 ^o PICO = 2918 cm ⁻¹ ⇒ | ALCANO C-H |
| 2 ^o PICO = 1444 cm ⁻¹ ⇒ | Deformação assimétrica CH ₃ |
| 3 ^o PICO = 1380 cm ⁻¹ ⇒ | Deformação simétrica CH ₃ |
| 4 ^o PICO = 979 cm ⁻¹ ⇒ | OLEFINAS |
| 5 ^o PICO = 883 cm ⁻¹ ⇒ | OLEFINAS |

5.4 Análise Cromatográfica

5.4.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

Os constituintes identificados no OE da CMH, do ponto de vista biossintético, são predominantemente de origem do ácido mevalônico (Figura 17), pertencentes à classe dos terpenóides, e, aproximadamente todos os constituintes identificados são sesquiterpenos. A biossíntese dos poliisoprenos ocorre pela via do Pirofosfato de geranila obtendo-se polímeros de isoprenóides que formam os sesquiterpenos constituintes ativos dos óleos essenciais.

**Figura 17:** Rota Biossintética dos Sesquiterpenos.Fonte: (TAPPIN *et al.*, 2004).

Na Tabela 9, estão apresentadas as substâncias majoritárias, encontradas no OE da CMH na sua maioria, compostos por sesquiterpenos e monoterpenos formando um total de 63 componentes, perfazendo um total de 100,00 %. O espectro cromatográfico do OE da CMH apresentou grupos funcionais de substâncias em regiões diferentes, cada uma delas, é correspondente para a presença de um tempo específico de retenção indicado na figura 18, porém para os constituintes majoritários que compõe o OE da CMH, apresentaram a fórmula estrutural, C₁₅H₂₄ e C₁₅H₂₆O. Constatando assim, que nas áreas dos picos mais elevados, se observou a presença de terpenos e terpenóides da classe dos sesquiterpenos, cujos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial das folhas da CMH foram: *trans* – γ – Cadineno 1,88 %, Globulol 2,00 %, Sphatunelol 2,01 %, α – Copaeno 2,72%, Cariofileno 5,28 %, τ – Cadinol 5,45 %, τ – Muurolol 5,51 %, *trans*-Cadina-1(2),4-dieno 8,91 %, γ – Elemeno 9,71 %, e, Germacreno – D 37,18 %.

Tabela 9: Cromatograma gasoso das substâncias majoritárias encontradas no OE da CMH.

| Pico | Tempo de retenção | Composto | Fórmula | Área do Pico | Porcentagem |
|------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------|
| 30 | 30,946 | <i>trans</i> – γ – cadineno | C ₁₅ H ₂₄ | 13693775,496 | 1,88 % |
| 42 | 33,021 | Globulol | C ₁₅ H ₂₆ O | 14635422,64 | 2,00 % |
| 41 | 32,834 | Sphatunelol | C ₁₅ H ₂₄ O | 14708421,43 | 2,01 % |
| 8 | 26,621 | α – copaeno | C ₁₅ H ₂₄ | 19836892,462 | 2,72% |
| 13 | 28,037 | cariofileno | C ₁₅ H ₂₄ | 38531626,37 | 5,28 % |
| 56 | 35,020 | τ – cadinol | C ₁₅ H ₂₆ O | 39793973,5 | 5,45 % |
| 53 | 34,664 | τ – muurolol | C ₁₅ H ₂₆ O | 40235743,128 | 5,51 % |
| 31 | 31,237 | <i>trans</i> -cadina-1(2),4-dieno | C ₁₅ H ₂₄ | 65030810,485 | 8,91 % |
| 27 | 30,45 | γ – elemeno | C ₁₅ H ₂₄ | 70909759,198 | 9,71 % |
| 25 | 30,031 | Germacreno – D | C ₁₅ H ₂₄ | 271514213,114 | 37,18 % |

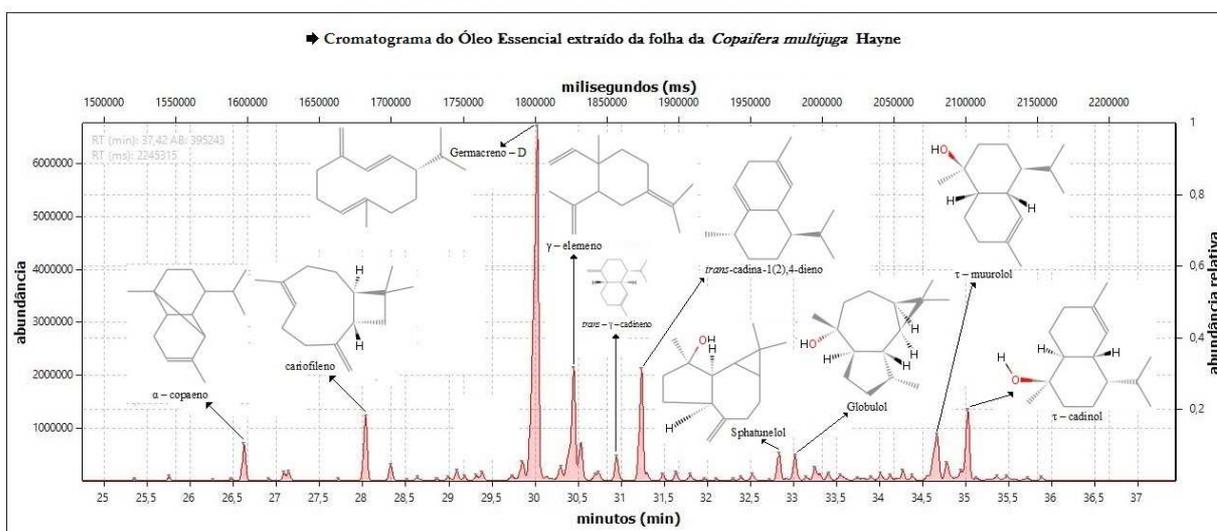


Figura 18: Cromatograma do OE da CMH.

5.5 EHL requerido para o OE de CMH

Depois de realizado o procedimento descrito, obtivesse o sistema nanoemulsionado. Este pequeno tamanho das gotas confere sua estabilidade, evitando a sedimentação (cremeação). Após o repouso, as dispersões foram avaliadas visualmente, sendo observado que para as menores concentrações do OECMH foi onde se conseguiu o sistema nanoemulsionado estável. Sendo assim, após diversos testes denominados pilotos, constatou-se que, para obter a preparação ideal e, em conformidade com as características distintas analisadas em nanoemulsões, as concentrações que corroboram para que isso ocorra e se obtenha o escopo desejado, seria a preparação de um tensoativo cujo EHL seja igual a 12, 13 e 14.

5.5.1 Estabilidade das nanoemulsões

Na figura 19, observou-se que, no preparo das nanoemulsões, as concentrações mais adequadas e estáveis, destacaram-se: S80T80EHL = 12 [10%], S80T80EHL = 13 [10%] e a S80T80EHL = 14 [10%].

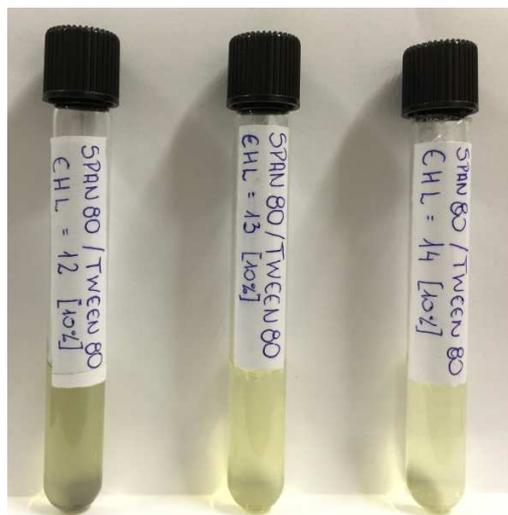


Figura 19: Nanoemulsões mais estáveis.
Foto – Thiago César Moreira

5.5.2 O Potencial Zeta, o tamanho e a dispersão das nanoemulsões

A repulsão eletrostática das partículas coloidais é chave para a compreensão da estabilidade de qualquer dispersão. A medida da mobilidade electroforética, mesmo em solventes não polares, fornece informações valiosas. As características da superfície do óleo essencial foram estudadas através de curvas de potencial zeta usando PALS (Phase Analysis Light Scattering) da nanoemulsão (Tabela 10). O estudo da curva do potencial zeta da nanoemulsão de OE_{CMH} permitiu a medir a estabilidade da suspensão além de fornecer informações sobre o diâmetro das partículas a estabilidade da suspensão em água (Figuras 20, 21 e 22). Os altos valores de potencial zeta indicaram uma maior estabilidade da suspensão. Trabalhos similares usando nanoemulsões de OEs encontraram resultados similares de estabilidade (BALAKUMAR, RAGHAVAN e ABDU, 2013).

Tabela 10: Potencial Zeta, o tamanho e a dispersão das nanoemulsões das nanoemulsões para o EHL a 10% de tensoativo

| EHL - T 10 % | | | | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| EHL | Tamanho/Size (média em nanômetros) | Desvio Padrão do Tamanho/Size | I.P.D. (média) | Desvio Padrão do I.P.D. | Zeta (média da condutividade) | Desvio Padrão do Zeta |
| 12 | 21,52 | ± 3,5 | 0,392 | ± 0,08 | - 12,5 | ± 0,65 |
| 13 | 25,72 | ± 4,8 | 0,438 | ± 0,075 | - 14,8 | ± 0,79 |
| 14 | 32,22 | ± 6,7 | 0,358 | ± 0,064 | - 11,2 | ± 0,48 |

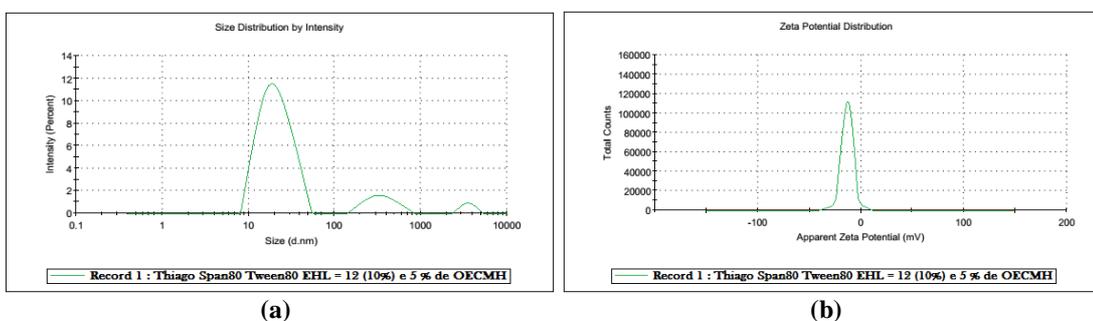


Figura 20. (a) Distribuição do diâmetro das nanopartículas. (b) Potencial Zeta da nanoemulsão do EHL = 12.

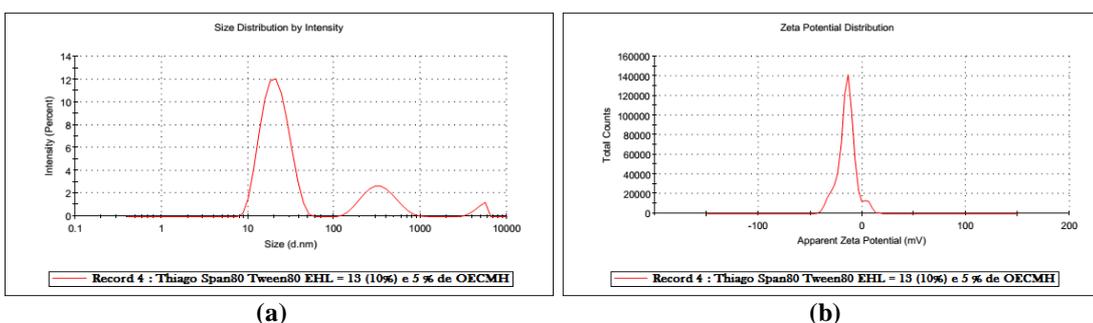


Figura 21. (a) Distribuição do diâmetro das nanopartículas. (b) Potencial Zeta da nanoemulsão do EHL = 13.

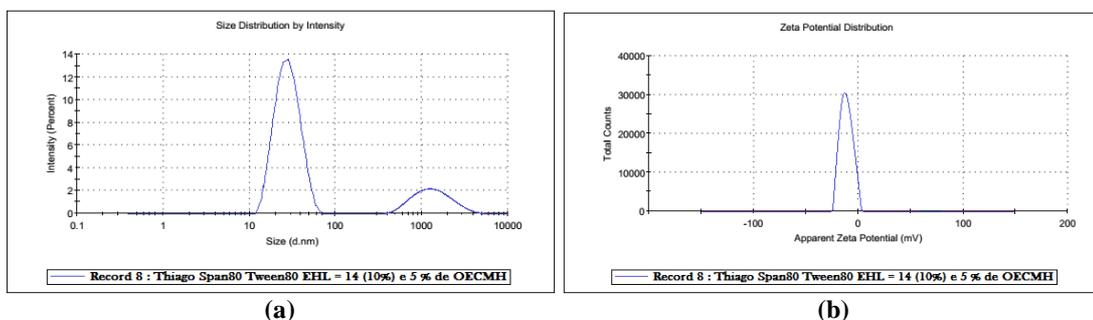


Figura 22. (a) Distribuição do diâmetro das nanopartículas. (b) Potencial Zeta da nanoemulsão do EHL = 14.

5.6 Teste da atividade biológica

5.6.1 Teste da viabilidade celular do óleo essencial e das nanoemulsões em macrófagos

Desta forma, a figura 23 demonstra a porcentagem de macrófagos viáveis após o tratamento com as diferentes preparações e concentrações do das nanoemulsões com o óleo essencial extraído das folhas da CMH, dissolvidos no solvente propilenoglicol (SV-PPG), entretanto, utilizando – se apenas o óleo puro, observamos que ele seja tóxico. Apesar disso, verificou – se que, nas nanoemulsões do OE para as concentrações analisadas S80T80EHL = 12 [10%] e S80T80EHL = 13 [10%], constatou-se que ambas não apresentaram toxicidade sobre os macrófagos, muito pelo contrário, e, que a aplicação das nanoemulsões favoreceu o aumento da concentração tissular dos macrófagos, principalmente para a S80T80EHL = 12 [10%].

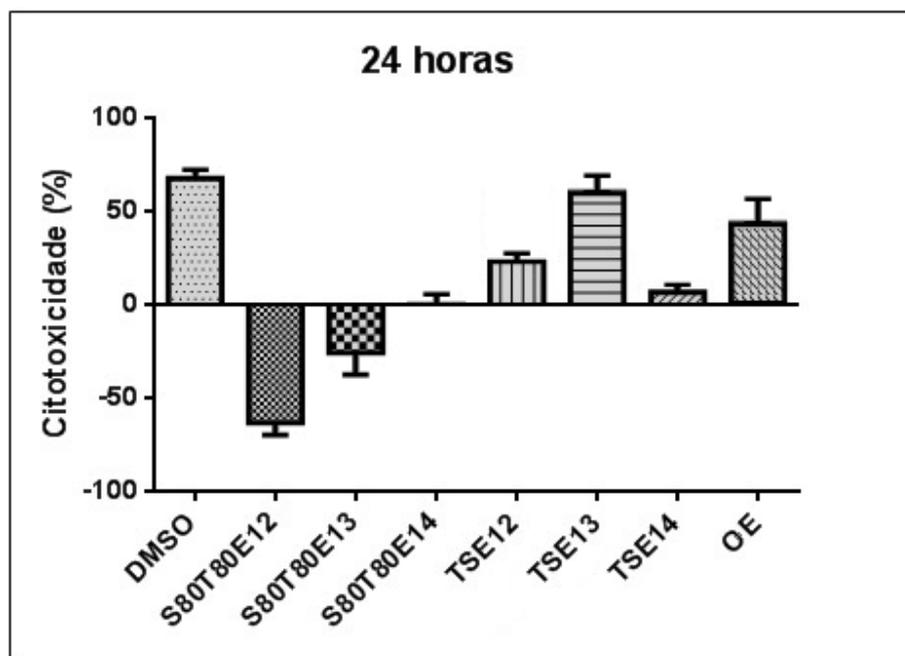


Figura 23. Viabilidade celular das nanoemulsões em macrófagos de camundongos linha J774.

5.7 Teste da atividade microbiológica

A atividade antimicrobiana de um óleo essencial pode ser, às vezes, interpretado de maneiras diferentes, inicialmente por conta do seu pH ácido, e, portanto com características hidrofílicas, como também, a presença de algumas frações voláteis contidas no mesmo, que podem demonstrar relevância quanto ao seu potencial antimicrobiano. Na tabela 11, em se tratando do OE da CMH e das nanoemulsões, o valor obtido referente ao halo de inibição observado no crescimento bacteriano para óleos essenciais com características sesquiterpênicas, nos leva a destacar a sua importância, uma vez que, a espécie de uma de bactéria com elevado grau de patogenicidade, denominada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demonstrou uma sensibilidade relevante, cujo halo de inibição e sensibilidade observado frente ao OE da CMH, foi de 8,34 mm, enquanto que, para as nanoemulsões não foi observada nenhuma atividade antibacteriana.

Tabela 11: Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente ao OE da CMH e as nanoemulsões.

| ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA | | | | |
|--------------------------|------------------------------------|---|---|-------------------------------|
| | ($\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$) | Cepa Bacteriana | Halo de Inibição (média em milímetros) | Desvio Padrão (milímetros) |
| OECMH | 20 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 8,34 | $\pm 0,22$ |
| S80T80EHL = 12 [10%] | 20 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | < 5,0 | $\pm 0,60$ |
| S80T80EHL = 13 [10%] | 20 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | < 5,0 | $\pm 0,47$ |
| S80T80EHL = 14 [10%] | 20 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | < 5,0 | $\pm 0,19$ |

6 CONCLUSÕES

No estudo da caracterização físico – química, espectroscópica, cromatográfica, avaliação das atividades biológicas, microbiológicas e obtenção de nanoemulsão do óleo essencial das folhas de *Copaifera multijuga* Hayne, pôde-se concluir que:

- 1) O rendimento médio do OE de CMH extraído por hidrodestilação foi de 0,538 %, que difere do valor encontrado por ALMEIDA, 2009 (0,65);
- 2) O OE_{CMH} apresentou um pH igual a 4,58, indicando ser ácido, porém com características lipofílicas, aspecto justificável pela presença de suas ligações químicas, evidenciada nos compostos hidrocarbonetos;
- 3) O Índice de Refração, de 1,5045 a 20,0 °C aferi as refringências de OE_{CMH}, assim de acordo com sua natureza, está associado ao tamanho da cadeia hidrocarbonada, sendo uma constante para o óleo, este índice é útil na identificação da substância, como também na detecção da presença de impurezas ou adulteração;
- 4) A análise do CG/MS permitiu a identificação dos compostos de natureza terpenóica, classificadas ainda como sesquiterpênicos, se destacando como MAJORITÁRIOS os seguintes componentes: Germacreno-D (37%), γ -elemeno (9,71%); transcadina-1(2), 4-dieno (8,91%); τ -muurolol (5,51%); τ -Cadinol (5,45%), Cariofileno (5,28%), α -Copaeno (2,72%);
- 5) O UV-Vis demonstrou o comprimento de onda absorvido entre 251 até 264 nm, características das ligações químicas presentes de substâncias denominadas dienos conjugados;
- 6) A análise de IR-FT demonstrou no OE_{CMH} os tipos de ligações entre carbono-carbono e carbono-hidrogênio, as saturações e insaturações envolvidas e as forças de suas ligações, caracterizando a presença de hidrocarbonetos classificados como terpenóides/sesquiterpenos;
- 7) As condições ótimas de obtenção de nanoemulsão do OE ocorreram com as seguintes variáveis:

- a) Em relação ao tensoativo ideal foi ao que apresentou EHL igual a 12, 13 e 14;
 - b) Em relação à estabilidade das nanoemulsões, as concentrações de tensoativos mais adequadas e estáveis, destacaram-se: S80T80EHL = 12 [10%], S80T80EHL = 13 [10%] e a S80T80EHL = 14 [10%];
 - c) Em relação ao Potencial Zeta das nanoemulsões, se obteve o valor de -14,8 mV, indicando maior estabilidade da suspensão, ocorrendo com 10% de tensoativo e EHL igual a 13;
- 8) O OE demonstrou uma eficácia admissível contra linhagem de células bacterianas *in vitro*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- 9) O OE apresentou atividade classificada como bacteriostática, enquanto era acompanhado por uma toxicidade significativa para macrófagos;
- 10) Nas nanoemulsões não ocorreu citotoxicidade contra as células bacterianas nem contra macrófagos dos camundongos;
- 11) Estudos farmacológicos adicionais com o OE_{CMH} utilizando outros modelos são de extrema importância, pois servirão para dar maior sustentabilidade aos resultados, bem como para elucidação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos encontrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; HAYAT, K.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; ZHANG, X. An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139-157, 2013.

ALMEIDA, A. P. **ESTUDO FITOQUÍMICO E AÇÃO LEISHMANICIDA DOS ÓLEOS RESINA E ESSENCIAL DA *Copaifera multijuga* Hayne CONTRA *Leishmania amazonensis* in vitro e in vivo**. 2009. Universidade Federal de Rondônia

ARAÚJO, R. S. Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário. 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALAKUMAR, K.; RAGHAVAN, C. V.; ABDU, S. Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of Rosuvastatin calcium: design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 337-343, 2013.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2009.

BAST, A.; CHANDLER, R. F.; CHOY, P. C.; DELMULLE, L. M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S. B. A.; KELLER, K.; KOEMAN, J. H.; PETERS, P.; PRZYREMBEL, H. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 195-211, 2002.

BERNAL, J.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 4, p. 758-774, 2011.

BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. 2011. Universidade de São Paulo

BOYD, J.; PARKINSON, C.; SHERMAN, P. Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 41, n. 2, p. 359-370, 1972.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11-20, Jul 15 2012.

CANNON, J. B. Emulsions and Microemulsions for Drug Solubilization and Delivery. **Water-Insoluble Drug Formulation**, p. 169, 2000.

CONSTANTINO, C. **Filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett (LB) de Ligninas. 1999.** 1999. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)-IFSC/USP, São Carlos, São Paulo

CUCHEVAL, A.; CHOW, R. A study on the emulsification of oil by power ultrasound. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 916-920, 2008.

DE DAVID, M.; DOS SANTOS MAMEDE, J. S.; DIAS, G. S.; PASA, M. C. USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM COMUNIDADE ESCOLAR DE VÁRZEA GRANDE, MATO GROSSO, BRASIL. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, 2014.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by "HLB". **J Soc Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1946.

KOBAYASHI, I.; YASUNO, M.; IWAMOTO, S.; SHONO, A.; SATOH, K.; NAKAJIMA, M. Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, n. 1, p. 185-196, 2002.

LIFSHITZ, I. M.; SLYOZOV, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 19, n. 1, p. 35-50, 1961.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. Universidade de São Paulo

OTTOBELLI, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J.; LUZ, C. C.; BRASIL, H. O. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; BRAZ-FILHO, R. Chemical study of two Amazonian medicinal plants: *Philodendron scabrum* K. Krause (Araceae) and *Vatairea guianensis* Aubl.(Fabaceae). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2011.

PARKINSON, M. Bio-surfactants. **Biotechnology advances**, v. 3, n. 1, p. 65-83, 1985.

PEDROSO, R.; SILVA, C. D. P.; FURLAN, C. M. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: *Cravórana* (*Porophyllum Ruderale* [Jacq.] Cass) e *Varão-de-Ouro* (*Solidago* SP.). 2009.

PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* spp). 2010.

POLETTI, P.; DUARTE, J.; THÜRMER, M. B.; ZENI, M. Estudo de membranas de poliamida preparadas pelo método de inversão de fases a partir do sistema ternário água/ácido clorídrico/poliamida 66. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 11, n. 7, p. 550-557, 2010.

PONZIO, E. A. **Nanocompósitos de Blendas Poliméricas Condutoras e Óxidos de Metais de Transição**. 2006. Universidade de São Paulo

PROBST, I. D. S. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012.

RAMOS, M. F. D. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. Universidade de São Paulo

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revta Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SANTOS, F. R. A. D. Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações. 2011.

SANTOS, F. R. B. F., R. ; CASTRO, R. N. ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DE PITANGA (*Eugenia uniflora* L.): COMPOSIÇÃO QUÍMICA versus IDADE DAS FOLHAS. **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014.

SARKER, S.; NAHAR, L. **Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry**. John Wiley & Sons, 2007.

SCHRÖDER, V.; SCHUBERT, H. Production of emulsions using microporous, ceramic membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 103-109, 1999.

SILVA JUNIOR, E. A. D. **Estudos de metabolismo in vitro de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina**. 2013. Universidade de São Paulo

SILVA, M.; USHIMARU, P.; BARBOSA, L.; CUNHA, M.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

SILVEIRA, J. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SMITH, A. L. **Theory and Practice of Emulsion Technology**. Elsevier, 2012.

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

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 145-149, 2004.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

TAPPIN, M. R.; PEREIRA, J. F.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TREGUIER, J.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions And Diagrams Of Water-Surfactant-Oil Systems-Study On Water-Brij-92 (96)-Vaseline System-Influence Of Hydrophilic Properties Of Surfactant. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 50, n. 12, p. 421-431, 1975.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WELIN-BERGER, K.; BERGENSTÅHL, B. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. **International journal of pharmaceutics**, v. 200, n. 2, p. 249-260, 2000.

WEN, L.; PAPADOPOULOS, K. D. Effects of osmotic pressure on water transport in W 1/O/W 2 emulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 235, n. 2, p. 398-404, 2001.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 61-68, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.