

## 1. INTRODUÇÃO

A *Curcuma longa* Linnaeus é uma planta de origem Asiática conhecida mundialmente, pois, o seu rizoma seco e moído é usado como condimento, o açafrão, que tem a capacidade de dar cor natural a alimentos, diferente do “açafrão verdadeiro” que é produzido com as anteras da flor de *Crocus sativus*. Parry (1969) relata que os rizomas maduros dessa planta contêm amido, óleo essencial e pigmentos corantes, entre esses, a curcumina, de cor amarelo-alaranjada, empregada em alimentos.

Sigrist (2009) afirma que o produto comercializado possui uma infinidade de usos finais, como na fabricação de sopas desidratadas, pratos e temperos prontos, mostardas, salsichas, margarinas, macarrão, *snacks* e salgadinhos. Esta diversidade de aplicações na indústria alimentícia fez com que, em países onde a cultura tem status de *commodity*, fossem criadas agências reguladoras da produção e qualidade para padronização da matéria-prima comercializada.

Na Amazônia brasileira, mais especificamente no Estado do Acre, conhecida comumente como açafroa ou açafrão-da-terra é uma planta muito comum nos quintais das casas dos produtores de farinha de mandioca, pois, o seu rizoma serve para dar a coloração amarelada ao produto, que é muito apreciado em toda a região.

Segundo Van Velthem; Hussak (2012), os produtores o colocam na farinha atendendo aos pedidos dos comerciantes, já que os consumidores de várias regiões preferem uma farinha amarelada a uma de cor branca. No entanto, a *C. longa* L. deve ser usada a uma concentração de 0,003%, pois, Álvares et al. (2015) informam que o açafrão-da-terra contém níveis de Potássio (K), Fósforo (P) e Cálcio (Ca) relativamente altos, resultando em um teor de cinzas elevado, entre 2 e 9%. Entretanto, neste mesmo trabalho, farinhas com a maior concentração de açafrão-da-terra (0,03% e 1%) apresentam menores teores de umidade e de atividade de água.

Maia et al. (2004) afirmam que vários estudos conclusivos sobre os condimentos têm demonstrado que estes apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais, e existem evidências de que o aumento do consumo dos condimentos pode levar a uma mudança na microbiota intestinal, reduzindo a incidência de câncer.

A *C. longa* tem uma longa história de usos terapêuticos e uma importante atividade antimicrobiana, antifúngica, inseticida, anti-inflamatória e propriedades antioxidantes (FERREIRA et al., 2013), sendo ainda *C. longa* e *C. xanthorrhiza* usadas para tratar estomatite, hepatite, diabetes, aterosclerose e infecções bacterianas, como condimento,

cosmético, medicamento, como pimenta ao ser adicionado ao *curry* dando a coloração típica do produto, para corar queijo, manteiga e outras comidas (ROHAETI et al., 2014).

O açafrão e curcuminóides naturais têm sido usado há séculos em preparações terapêuticas. Na medicina Ayuverdica a curcumina é bem documentada no tratamento de doenças respiratórias como asma, hiperatividade brônquica e alergia, desordens hepáticas, anorexia, reumatismo, ferimentos em pacientes com diabetes, corrimentos nasais, tosse e sinusite. Na medicina chinesa tradicional está associada ao tratamento de dores abdominais. Na antiga medicina Hindu era usada no tratamento de entorses e inchaços (GOEL et al., 2008).

Na pesquisa científica moderna se descreve o uso como antioxidante, anti-inflamatório, anticarcinogênico e antimicrobiano, hepatoprotetor, trombosupressor, proteção contra infarto do miocárdio, no tratamento contra a hipoglicemia, artrite e artrite reumatóide (GOEL et al., 2008). Os curcuminóides de *C. longa* possuem atividade inibidora das neuraminidases do vírus influenza A (DAO et al., 2012), doenças neurodegenerativas e do metabolismo, a curcumina também inibe diretamente alguns alvos biológicos (fatores de transcrição e proteínas quinases) segundo Koeberle et al. (2014).

Embora se utilize muito os rizomas de *C. longa* L. para a produção do açafrão também é possível extrair o óleo essencial tanto dos rizomas quanto das folhas desta planta, cada um tem o seu aroma característico e que pode ser usado em diversas aplicações experimentais contra o *Aspergillus flavus*, fungo produtor de aflotoxinas (FERREIRA et al., 2013) e na fabricação de nanocápsulas para o combate ao câncer (NATRAJAN et al., 2015). Existem poucos trabalhos publicados sobre a produção do óleo essencial das folhas de *C. longa* L. um deles é uma pesquisa sobre o combate às larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles quadrimaculatus* (ALI et al., 2015), por exemplo.

Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelas plantas para sua sobrevivência. A espécie vegetal produz compostos primários, tais como açúcares e nitrogenados, e também compostos secundários, que não são utilizados diretamente para sua alimentação e nutrição. Entre os compostos secundários estão os alcalóides, os flavonóides, as saponinas e os óleos essenciais. Os óleos essenciais são substâncias químicas que exercem as funções de auto-defesa e de atração de polinizadores. A planta produz óleos essenciais nas seguintes partes: flores, cascas de frutos (denominados cítricos), folhas e pequenos grãos (“*petitgrain*”), raízes, cascas da árvore, resinas da casca, sementes (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

Denominam-se tricomas as glândulas onde fica encapsulado o óleo essencial na planta. Estes tricomas são rompidos naturalmente pela espécie vegetal, liberando o óleo essencial, que forma uma espécie de “nuvem aromática” ao seu redor. Os tricomas também são rompidos durante os processos intencionais de extração do óleo essencial. O óleo essencial não é um produto simples de 1 componente, é um produto composto podendo ultrapassar 300 componentes químicos diferentes. Tal diversidade e complexidade fazem do óleo essencial puro um produto altamente valorizado, com aplicação em diversas áreas: área da saúde devido ao seu potencial terapêutico, área da perfumaria e cosmética devido a sua refinada e complexa composição aromática, área alimentícia devido ao seu potencial como aditivo flavorizante, área de aromatização ambiental e produtos domosanitários, e a mais nova área, que é a da moda, confeccionando fibras onde os óleos essenciais inicialmente retidos vão sendo liberados na medida da utilização das peças em couro, bolsas, cintos, roupas (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

O presente trabalho visou analisar por espectroscopia as principais diferenças entre os óleos essenciais extraídos das folhas e dos rizomas do açafrão-da-terra, visando a comparação deles e a produção de nanoemulsões para serem testadas afim de saber se existe a ação bactericida e atividade celular, este estudo buscou especificamente:

- a) Isolar o óleo essencial da folha e do rizoma de *Curcuma longa* L.;
- b) Desenvolver nanoemulsões a partir de ambos os óleos; Fazer análise das nanoemulsões pelo Potencial Zeta;
- c) Análise e comparação dos óleos essenciais por Espectroscopia Raman, Espectroscopia Infravermelho e Ultravioleta e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa;
- d) Fazer teste de atividade das nanoemulsões e dos óleos frente a macrófagos e a bactérias;

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Curcuma longa* Linnaeus

A açafrão (*Curcuma longa* L.) é uma planta monocotilêdonea pertencente à família Zingiberaceae. Classificada como planta condimentar, é conhecida popularmente no Brasil como açafrão, açafrão-eira, açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, batatinha amarela, gengibre dourada, mangarataia (MAIA et al., 1995), curcuma ou cúrcuma e açafrão (no Acre). A açafrão (Figura 1) é uma planta originária do sudeste da Ásia, mais precisamente das florestas tropicais da Índia, país detentor da maior produção mundial e local onde ocorre a máxima diversidade genética (SASIKUMAR, 2005). Embora a maior diversidade varietal ocorra no Nordeste da Índia, grande parte dos parentes silvestres e plantas invasoras de *C. longa* encontram-se na região Sudoeste. Por estas razões, é amplamente aceito que a Índia é o centro de origem da cúrcuma cultivada atualmente (RAVINDRAN et al., 2007).



**Figura 1:** Parte aérea da *Curcuma longa* L., sem a inflorescência.

O gênero apresenta aproximadamente 1.400 espécies descritas, sendo reconhecidas seis variedades taxonômicas de *C. longa* baseadas em taxonomia numérica: *C. longa* var. *typica*, *C. longa* var. *atypica*, *C. longa* var. *camphora*, *C. longa* var. *spiralifolia*, *C. longa* var. *musacifolia* e *C. longa* var. *platifolia*. A maioria das variedades de *C. longa* encontradas na Índia e utilizadas agronomicamente pertencem a *C. longa* var. *typica* ou *atypica* (SASIKUMAR, 2005).

Trata-se de uma planta do tipo herbácea e perene, as condições ambientais da região sudeste fazem com que a planta se comporte como anual, essas condições principalmente devido às baixas temperaturas que ocorrem a partir da segunda semana de maio levam a

planta à senescência (CECÍLIO-FILHO, 1996). O ciclo do cultivo se estende de novembro a julho, perfazendo cerca de 240 dias. Para regiões de adequada temperatura, o ciclo da cultura será determinado por outros potenciais fatores ambientais limitantes, entre os quais se destaca a disponibilidade hídrica (CECÍLIO-FILHO et al., 2000).

No estado do Acre, a planta amarelece suas folhas nos meses de maio e junho, nos meses subsequentes as folhas murcham e caem, é o período do “verão amazônico”, (período do ano em que as chuvas ficam muito espaçadas) os cultivadores dizem que a açafroa “morre” (Figura 2), os rizomas continuam intactos no solo, no final de outubro as folhas voltam a nascer novamente e daí em diante irá florescer, logo chegará o período chuvoso, o “inverno amazônico”, período em que a planta produz folhas vistosas e a inflorescência.



**Figura 2:** Rizoma de *C. longa* depois que as folhas caem, no período do “verão amazônico”, neste período os cultivadores dizem que a açafroa morre.

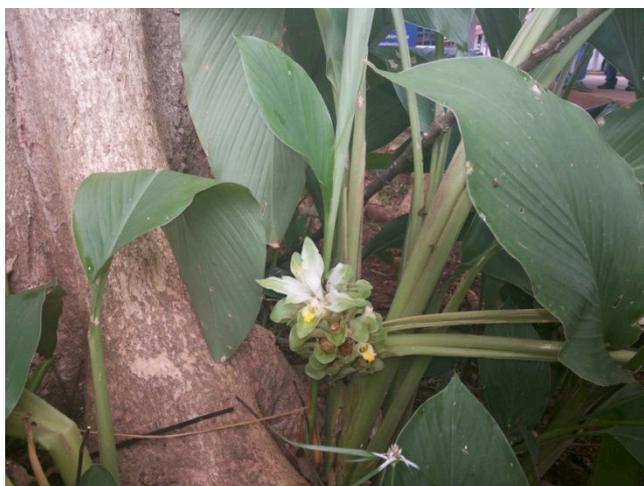
A espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, utilizada por garimpeiros para marcar regiões de garimpo e por escravos como condimento culinário. Desde então é cultivada ou encontrada de modo subespontâneo em vários estados. A planta atinge em média de 120 a 150 centímetros de altura em condições favoráveis. Suas folhas são grandes, oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, sendo os pecíolos de mesmo tamanho dos limbos. Estes se reúnem na base da planta, formando um pseudocaulo. A planta possui um rizoma principal denominado usualmente de ‘cabeça’ ou ‘pião’ o qual é periforme, arredondado ou ovóide. Ao redor destes, verificam-se ramificações secundárias denominadas de ‘dedos’, sendo estas compridas, também tuberizadas (HERTWIG, 1986). Estes rizomas se desenvolvem agrupados no solo, abaixo do colo da planta, organizados numa estrutura denominada ‘mão’ (Maia,1991), podendo apresentar ainda estruturas de reserva (bulbos). O

rizoma é o órgão da planta que apresenta interesse econômico, com diversas aplicações atuais e potenciais (Figura 3).



**Figura 3:** Rizomas de *Curcuma longa* L. se apresentando em uma estrutura chamada 'Mão', que tem o rizoma principal, chamado de cabeça, e rizomas secundários conhecidos como dedos.

A espécie é propagada vegetativamente por meio de propágulos-semente, a partir dos 'dedos' ou 'cabeças'. Apesar de produzir inflorescências (Figura 4) e de ser descrita como alógama, a produção de sementes dificilmente ocorre devido à incompatibilidade e à esterilidade do pólen (JOSEPH et al., 1999; SASIKUMAR et al., 1999). Outro fator que contribui para a dificuldade na obtenção de sementes viáveis se deve a evidências de que a espécie é triplóide, com número básico de cromossomos  $x=21$ . Em uma revisão citogenética do gênero *Curcuma*, Islam (2004) verificou a existência de variedades de *Curcuma longa* com  $2n = 3x = 62, 63$  e  $64$  cromossomos.



**Figura 4:** Inflorescência de *Curcuma longa*.

De acordo com Ravindran et al. (2007), a triploidia pode ter evoluído a partir da hibridação interespecífica entre plantas tetraplóides de *C. aromatica* e um ancestral diplóide de *C. longa* ( $2n=42$ ). Outra sugestão pode ser que estas últimas evoluíram uma da outra por mutação aos passos, sendo a forma triplóide um intermediário evolutivo. Em ambos os casos, o modo de reprodução predominantemente assexuado e o tamanho reduzido dos cromossomos podem ter favorecido a perpetuação da triploidia. Este aspecto também explica a dificuldade de obtenção de sementes, uma vez que em organismos triplóides a segregação meiótica é deficiente, diminuindo a probabilidade de formação de gametas viáveis e limitando o melhoramento genético por métodos clássicos de hibridação (VALOIS, 2001).

Apesar disso, variedades híbridas já foram desenvolvidas e encontram-se disponíveis em países onde a cultura apresenta maior destaque comercial, como no caso da Índia (SASIKUMAR, 2005). Considerando estes aspectos, o melhoramento genético da cultura usualmente tem sido realizado por meio de seleção clonal, seleção de germoplasma ou indução de mutação. Aliado a estas estratégias, métodos de cultura de tecidos parecem ser alternativas promissoras para incremento de variabilidade, tais como obtenção de variantes somaclonais e híbridos somáticos, indução de poliploidia, indução de mutação e transgenia via biobalística (SALVI et al., 2002; ISLAM, 2004; SHIRGURKAR et al., 2006).

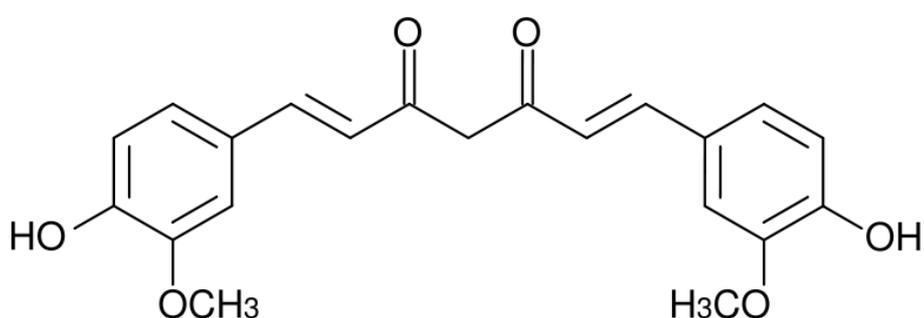
### **2.1.1 Compostos Químicos do açafrão (*Curcuma longa* L.)**

Do rizoma da *C. longa* L. seco e moído se extrai o açafrão que é um pó amarelo-alaranjado. O açafrão contém proteína (6.3%), gordura (5.1%), minerais (3.5%), carboidratos (69.4%) e moisture (13.1%). O óleo essencial obtido por destilação a vapor obtido dos rizomas (5.8%) tem  $\alpha$ -felandreno (1%), sabineno (0.6%), cineol (1%), borneol (0.5%), zingibereno (25%) e sesquiterpenos (53%). A Curcumina (diferoilmetano) (3–4%) é responsável pela cor amarela, que compreende a curcumina I (94%), curcumina II (6%) e a curcumina III (0.3%). A Desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina são derivadas e isoladas da curcumina (CHATTOPADHYAY et al., 2004).

A estrutura química da curcumina (diferoilmetano) foi determinada por Roughley; Whiting em 1973 (Figura 5). Ela funde a 176-177 °C e forma sais vermelho-castanho na presença de bases. A curcumina é solúvel em etanol, bases, cetona, ácido acético e clorofórmio e dimetilsulfóxido, é insolúvel em água, a curcumina é um polifenol hidrofóbico (CHATTOPADHYAY et al. 2004; ROUGHLEY; WHITING 1973). Na molécula da

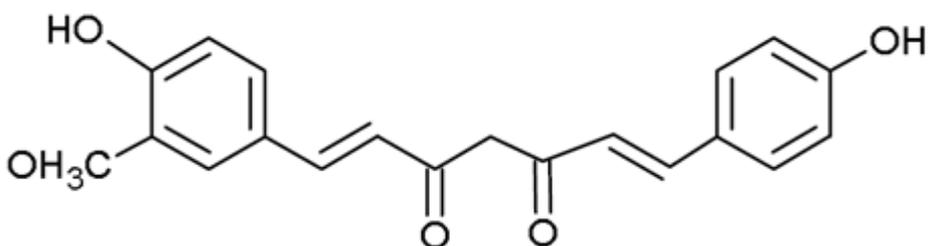
curcumina, a cadeia principal é um grupo alifático, insaturado e o grupo arilo pode ser substituído ou não (ARAÚJO; LEON 2001).

O açafrão contém compostos fenólicos (diarilheptanóide, diarilpentanóide derivados de fenilpropeno). Terpenóides (monoterpenóides, sequiterpenóides, diterpenóides e triterpenóide), diarilheptanóides (curcumina, turmerona, zingibereno), os curcuminóides são relatados como seus principais compostos químicos bioativos. A curcumina é o principal curcuminóide, um polifenol, princípio ativo da *C.longa*, e foi isolada pela primeira vez em 1815 (ROHAETI et al., 2014, CHATTOPADHYAY et al., 2004), cujo a fórmula é  $C_{21}H_{20}O_6$ .

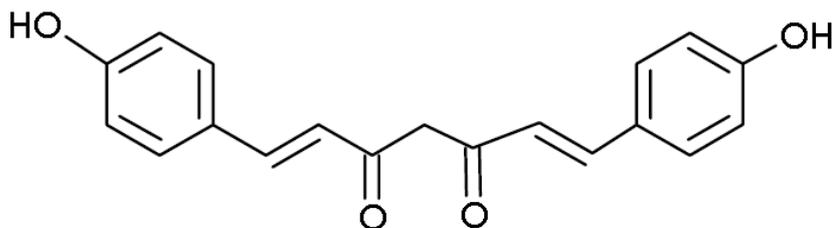


**Figura 5:** Fórmula Estrutural da Curcumina  
**Fonte:** Goel et al., 2008

A curcumina, presente em aproximadamente 77% do curcuminóides, a desmetoxicurcumina (Figura 6), conhecida como curcumina II, com presença aproximada de 17%, a bisdesmetoxicurcumina (curcumina III), com cerca de 3% de presença (Figura 7), e a ciclocurcumina são os curcuminóides mais presentes no açafrão, que chega a conter entre 3 e 5% de curcuminóides em sua composição (GOEL et al., 2008).



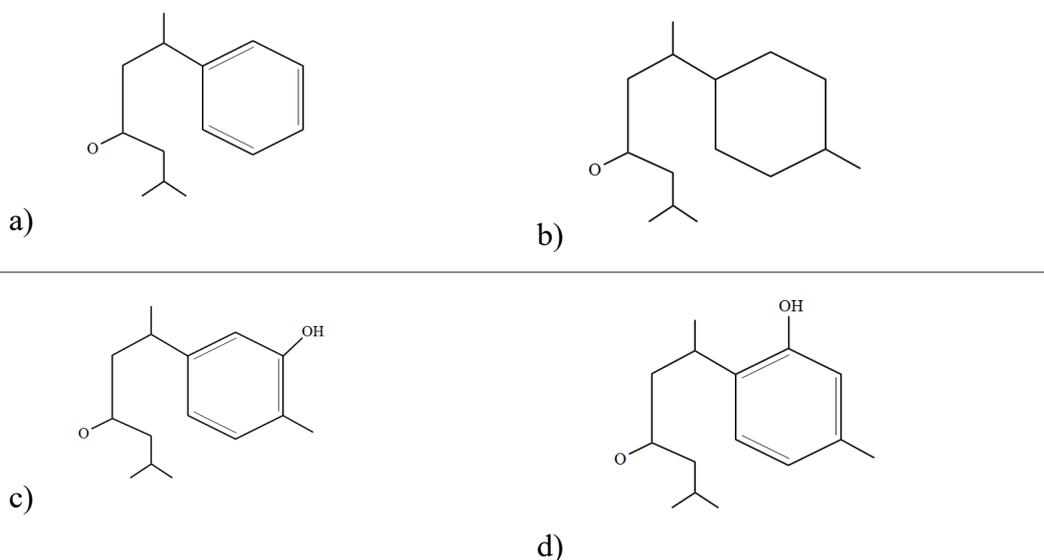
**Figura 6:** Fórmula estrutural da Desmetoxicurcumina. Adaptado de Braga, 2005



**Figura 7:** Fórmula estrutural da Bisdesmetoxicurcumina. Adaptado de Braga, 2005

A curcumina tem relativamente maior atividade incluindo a ação antioxidante, antibacteriana e propriedades anticancerígenas que as outras curcuminas. Um fator interessante é que sob condições ambientais diferentes os rizomas usados para a preparação de produtos herbais mostraram variação nas atividades farmacológicas (ANUBALA et al., 2014).

Outro componente com potencial de exploração são os óleos essenciais, presentes em concentrações que variam de 2,5 a 5,0% (GOVINDARAJAN, 1980). Estes são formados principalmente por turmerona, d-hidroturmerona e cetonas aromáticas (MARTINS; RUSIG, 1992). Analisando os óleos essenciais de cinco espécies de cúrcuma, Zwaving; Boss (1992) identificaram 23 constituintes, sendo ar-turmerona, turmerona e turmerol (Figura 8), responsáveis por cerca de 75% do óleo.

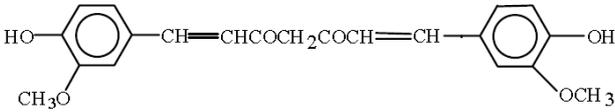
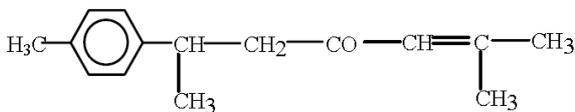
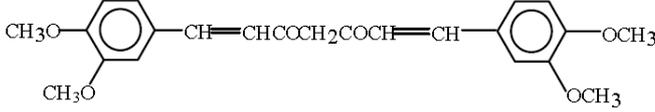
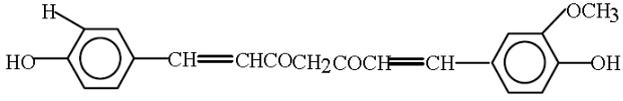
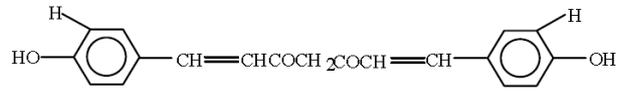
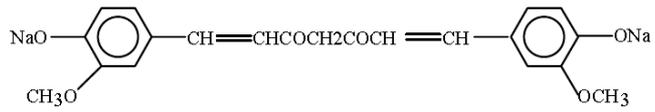


**Figura 8:** Estruturas químicas: a) Ar-Turmerona, b) Turmerona, c) Tumeronol A d) Tumeronol B  
**Fonte:** Adaptado de Sigrist (2009)

### 2.1.2 Atividades biológicas de *Curcuma longa* L.

Como relatado anteriormente a *C. longa* L. tem uma longa história de usos terapêuticos por vários povos asiáticos, a seguir uma lista de várias atividades biológicas atribuídas ao uso do açafrão e principalmente à Curcumina (Tabela 1).

**Tabela 1:** Curcumina e os derivados biológicos de *C. Longa* L. com atividades biológicas

Composto	Estrutura Química	Atividade
Curcumina		Antibacteriana <i>Leishmania amazonensis</i> Anti-HIV Antioxidante Anti-inflamatória Antitumoral
Ar-turmerona		Antiveneno de cobra
Metilcurcumina		<i>Leishmania amazonensis</i>
Desmetoxicurcumina		Antioxidante
Bisdesmetoxicurcumina		Antioxidante
Curcuminato de Sódio		Anti-inflamatório

Fonte: Araújo; Leon (2001).

### 2.1.2.1 Atividade Anti-inflamatória

Há uma grande número de trabalhos na literatura relativos à atividade de compostos extraídos de *C. longa* L. sendo potentes inibidores da inflamação. Estas substâncias podem ser classificadas como curcuminóides, análogos de Diarilheptanóides. Existem dois modelos de inflamação a serem estudados: modelos crônicos (granuloma e tecido de granulação), em que a inflamação e granulomas desenvolvem-se durante um período de tempo (vários dias), indicando a fase de inflamação proliferativa e os modelos agudos, onde efeitos agudos de agentes anti-inflamatórios podem ser estudados. Testando a sua ação inibitória sobre o desenvolvimento de edema em patas de rato Mukhopadhyay et al. (1982) demonstraram a atividade da curcumina e outros análogos semi-sintéticos (curcuminato de sódio, diacetilcurcumina, trietilcurcumina e tetrahidrocurcumina) em carragenina, induzindo um edema de pata e inflamação de granuloma em ratos. Nesses experimentos os autores utilizaram ácido ferúlico e fenilbutazona (medicamento de referência). A curcumina e os seus análogos mostraram ação semelhante em carragena induzindo edema em patas de rato; No entanto, o curcuminato de sódio foi o análogo mais potente e foi mais solúvel do que a curcumina em água. Entre os análogos de curcumina, a trietilcurcumina foi o anti-inflamatório mais potente no modelo crônico de inflamação quando comparado com os outros análogos e com as drogas de referência; a tetracurcumina não mostrou nenhuma atividade na condição de inflamação aguda, todas as substâncias eram mais eficazes. Os autores concluíram que a atividade dos compostos utilizados nestes experimentos dependem do modelo de inflamação. Arora et al. (1971) investigaram a atividade anti-inflamatória em diferentes frações do extrato dos rizomas de cúrcuma em éter de petróleo (dois componentes) em animais. Eles descobriram que os extratos reduziam o crescimento do granuloma sem efeitos tóxicos.

Chandra; Gupta (1972 ) demonstraram as ações anti-inflamatórias e antiartríticas de óleo volátil de *C. longa* L. Ghatak; Basu (1972) mostraram a ação do curcuminato de sódio como um agente anti-inflamatório, sendo melhor do que curcumina e o acetato de hidrocortisona em inflamação experimental induzida por carragenina e formalina em ratos albinos ( $DE_{50} = 144 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), o curcuminato de sódio é mais solúvel em água do que a curcumina e não foram observados efeitos colaterais.

As ações farmacológicas da curcumina como um agente anti-inflamatório foram examinadas por Srimal; Dhawan (1973), neste trabalho, os autores relataram que o composto foi eficaz na fase aguda bem como nos modelos de inflamação crônica, a potência da

curcumina é aproximadamente igual à Fenilbutazona no teste de edema induzido por carragenina, mas foi ativa em apenas metade dos experimentos crônicos. Observou-se que a curcumina foi menos tóxica que o medicamento de referência (sem mortalidade até uma dose de 2 g/kg<sup>-1</sup>). Huang et al. (1992) examinaram o efeito inibidor da curcumina na proliferação de células mononucleares do sangue e células vasculares dos músculos. Nas células mononucleares do sangue a curcumina foi capaz de prejudicar a resposta das células ao mitógeno, PHA, a resposta ao aloantígeno e ao MLR. Os pesquisadores sugeriram que a curcumina poderia ser usada clinicamente no transplante de aterosclerose. Os derivados do ácido cinâmico eram menos ativos do que curcumina. Ammon et al. (1992) demonstraram que a curcumina pode ser um inibidor da formação de leucotrienos nos neutrófilos peritoneais de rato, com uma EC<sub>50</sub> de 27x10<sup>-7</sup>M, em contraste com a hidrocortisona que não mostrou qualquer efeito.

O óleo essencial de *C. longa* e também os extratos de éter de petróleo, álcool e água mostraram efeitos anti-inflamatório. A atividade anti-reumática da curcumina também foi estabelecida em pacientes que apresentaram melhora significativa dos sintomas após a administração de curcumina. A curcumina estimula expressão de proteínas de estresse induzida pelo estresse e pode atuar de uma forma semelhante à indometacina e o salicilato. A Curcumina oferece efeito anti-inflamatório através da inibição da ativação da NFκB. A curcumina também mostrou reduzir a expressão do fator TNFα induzindo gênese tecidual em célula endotelial aórtica bovina, reprimindo ativação de ambas AP-1 e NFκB. O papel anti-inflamatório da curcumina é também mediado através da regulação negativa da ciclo-oxigenase-2 e o óxido nítrico sintetase indutível através da supressão da ativação da NFκB. A curcumina também aumenta a cicatrização de feridas em ratos e camundongos diabéticos, e na lesão induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em queratinócitos humanos e fibroblastos (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

### **2.1.2.2 Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante da curcumina foi relatada 1975. Ela age como um limpador de radicais livres de oxigênio. Ela pode proteger a hemoglobina a partir da oxidação. In vitro, a curcumina pode inibir significativamente a geração reativa de espécies de oxigênio (ROS) como superóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e geração de radicais nitrito por macrófagos ativados, os quais desempenham um papel importante na inflamação A curcumina também reduz a produção de

ROS in vivo. Seus derivados, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina também têm efeitos antioxidante. A curcumina exerce potente efeito inibidor contra a lesão induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em queratinócitos humanos, fibroblasts e em células NG 108-15 (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

Unnikrishnan; Rao (1995) estudaram as propriedades antioxidantes da curcumina e seus três derivados (desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina e diacetilcurcumina). Os autores demonstraram que estas substâncias podem proporcionar uma proteção contra a oxidação da hemoglobina a uma concentração tão baixa como 0,08 mM, exceto a diacetilcurcumina que tem pouco efeito na inibição de nitrito, induzindo a oxidação na hemoglobina.

O efeito da curcumina na peroxidação lipídica também foi estudada em diversos modelos por vários autores. A curcumina é um bom antioxidante e inibe a peroxidação lipídica dos microsomas em fígado de rato, membranas de eritrócitos e de células cerebrais (PULLA et al., 1994). A curcumina sequestra os radicais livres e inibe a peroxidação lipídica, agindo na proteção das células e das macromoléculas celulares, incluindo o DNA dos danos oxidativos (BIANCHI; ANTUNES 1999).

A peroxidação do lipídeo tem um papel principal na inflamação, em doenças cardíacas e no câncer. A cúrcuma pode reduzir a peroxidação lipídica através da manutenção das atividades de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em níveis mais elevados. Estas enzimas desempenham um papel importante na regulação da peroxidação dos lipídeos (PULLA et al.; 1992).

Pulla et al. (1992) observaram que a curcumina é capaz de vasculhar radicais livres de oxigênio tais como ânions de superóxido e radicais hidroxila, que são importantes para a iniciação da peroxidação lipídica. Outro artigo sobre curcuminóides como inibidores potentes da peroxidação lipídica foi descrito por Sreejayan; Rao (1994), em que os autores demonstraram que três curcuminóides eram inibidores da peroxidação de lipídeos em cérebro homogeneizado de rato e de microsomas de fígado de rato, estes compostos foram mais ativos do que o  $\alpha$ -tocoferol (droga de referência), a curcumina mostrou os melhores resultados. A metoxicurcumina parece desempenhar uma importante função, pois, o grupo fenólico, o grupo metoxi no anel fenil e o sistema 1,3 - dicetona parecem formar estruturas com importantes características que podem contribuir para estes efeitos. O sistema dicetona é um potente ligante para metais como ferro, utilizado nestes experimentos. Um outro fator proposto na literatura é que a atividade antioxidante aumenta quando um grupo fenólico está

ligado a um grupo metoxi na posição orto. O mecanismo de ação da curcumina ainda é desconhecido.

### **2.1.2.3 Atividade Antiprotozoária**

O primeiro trabalho a relatar a atividade da curcumina e de alguns derivados semi-sintéticos na literatura contra tripanossomatídeos foi estudada em promastigotas (extracelulares) e formas amastigotas (intracelulares) de *Leishmania amazonensis*. Os autores demonstraram que a curcumina (um curcuminóide fenólico) em experiências *in vitro* tem uma excelente atividade ( $DL_{50} = 24 \mu\text{M}$  ou  $9 \text{ mg/mL}$ ), e o derivado semi-sintético, metilcurcumina (um curcuminóide não-fenólico), tem a melhor ação com uma  $DL_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$  e  $DL_{90} = 35 \text{ mM}$  contra formas promastigotas, este derivado foi testado *in vivo* em ratos e mostraram uma boa atividade, com 65,5% de inibição do tamanho da lesão na almofada das patas de ratos, quando comparado com o grupo inoculado apenas com os parasitas (ARAÚJO et al. 1998, 1999). Outro ponto interessante mencionado pelos autores é que eles observaram não haver qualquer reação inflamatória na área onde as drogas foram injetadas, talvez porque curcuminóides são potentes inibidores da inflamação. Rasmussen et al. (2000) relataram a eficácia de um extrato etanólico de *C. longa* contra o *Plasmodium falciparum* e *L. major*, que foi capaz para inibir o crescimento *in vitro* destes parasitas.

### **2.1.2.4 Atividade Nematicida**

O óleo de curcuma foi estudado em *Paramecium caudatum* em diferentes concentrações, variando de 1 em 2000 para 1 em 5000. Os ciliados tornaram-se lentos e, finalmente, morreram (CHOPRA et al. 1941). Kiuchi et al. (1993) demonstraram a atividade das frações (metanólica e clorofórmica) de açafrão contra *Toxocara canis*. Neste trabalho eles isolaram um novo curcuminóide, a ciclocurcumina. Todas as substâncias não mostraram atividade quando aplicadas de forma independente, mas a atividade foi observada quando foram misturadas, sugerindo uma ação sinérgica entre elas.

### **2.1.2.5 Atividade Antibacteriana e Antifúngica**

O óleo da curcuma foi testada contra culturas de *Staphylococcus albus*, *S. Aureus* e *Bacillus typhosus*, inibindo o crescimento de *S. albus* e *S. aureus* em concentrações de até 1 a

5000 (CHOPRA et al. 1941) . Bhavani Shankar; Murthy (1979 ) investigaram a atividade das frações de cúrcuma contra algumas bactérias intestinais *in vitro*. Neste trabalho, a inibição total de crescimento de *Lactobacillus* na presença de cúrcuma foi observada (4,5-90 µL/100 mL). A outra fração, o extrato alcoólico , foi eficaz também (10-200 mg/mL), mas a inibição não era é igual como a com o açafrão. A curcumina (2.5-50 mg/mL ), apenas inibiu *S. Aureus*.

No trabalho de Kuhn et al. (2006) foi possível verificar a ação do extrato aquoso de *C. longa* L. contra a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* comparado com o antibiótico Oxitetraciclina. E concluíram que a cúrcuma exerce atividade *in vitro* contra *X. axonopodis* pv *Manihotis*.

Sunilson et al. (2009) utilizaram os rizomas de *C. longa* para fazer extrações com éter de petróleo, cloroformio, metanol e água frente às bactéria *E. coli*, *S. enteritidis*, *C. perfringens*, *S. aureus* e *C. jejuni* e aos fungos *B. cereus*, *S. cerevisiae*, *H. anomala*, *M. mucedo* e *C. albicans* comparando o desempenho dos extratos com o antibiótico padrão Ofloxacino e o fungicida padrão Fluconazol. O melhor extrato foi o produzido com metanol, apresentado atividade bactericidas e fungicidas, concluindo que o extrato produzido com metanol possui propriedades antifúngicas e antibacterianas devido a presença de compostos fenólicos. Balbi-Peña et al. (2006) estudaram o potencial antifungico do açafrão e da curcumina contra *Alternaria solani* em tomateiros com o uso de soluções alcoólicas, o resultado alcançado foi o de inibição micelial *in vitro*.

Os extratos de éter, clorofórmio e óleo de *C. longa* têm efeitos antifúngicos. O extrato bruto etanólico também possui atividade antifúngica. O óleo do açafrão também é ativo contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium digitatum* (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.6 Atividade Antiveneno**

A atividade potente do antiveneno foi testado contra picada de cobra. A fração que consistia em ar-tumerona, isolada a partir de *C. longa* L , neutralizou tanto a atividade hemorrágica e quanto o efeito letal de veneno em ratos . Neste estudo ar – turmerona era capaz de abolir a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops* e cerca de 70 % do efeito letal do veneno de *Crotalus*. A Ar-tumerona pode atuar como um inibidor enzimático, no caso de enzimas de veneno com atividades proteolíticas e hemorrágicas (FERREIRA et al., 1992).

### **2.1.2.7 Atividade Antiviral e Anti-HIV**

A curcumina mostrou ter atividade antiviral atuando como um inibidor eficaz da chave do vírus de Epstein-Barr (EBV) ativando o fragmento Bam H deixando a (BZLF1) proteína de transcrição das células em Raji DR-LUC. Indutores EBV tais como 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato, butirato de sódio e o fator de transformação de crescimento-beta aumentam o nível de RNAm BZLF1 em 12-48 h depois do tratamento nestas células, que é bloqueado pela curcumina. A curcumina também mostra atividade anti-VIH (vírus da imunodeficiência humana), atividade de inibição da integrase do HIV-1 necessária para replicação viral. Também inibe a expressão do gene UV do HIV. Assim, a curcumina e os seus análogos podem ter o potencial para o desenvolvimento de medicamentos novos contra o HIV (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

Mazumber et al. (1995) demonstraram que a curcumina tem uma atividade antiviral, sendo um inibidor da integrase do HIV - 1 ( $IC_{50} = 40 \mu M$ ) e sugeriu que os análogos da curcumina podem ser desenvolvidos como drogas anti-AIDS . Os dados mostraram que a curcumina inibiu a replicação da proteína integrase do HIV-1. Eigner; Scholz (1999) relataram que a curcumina foi reivindicada para ser usada como anti-HIV-1 e anti-HIV-2 em um pedido de patente.

### **2.1.2.8 Atividade Antitumoral**

Huang et al. (1988), estudaram o efeito da curcumina, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido ferúlico na evolução de tumor de pele em rato causado por 12-o-tetradecanoil-13-acetato (TPA), observou-se que todos estes compostos inibem a ornitina descarboxilase (ODC) epidérmica e a síntese do DNA da epiderme, sendo que a curcumina foi mais eficiente. Em um outro trabalho (1991), os resultados sugeriram que a curcumina foi um inibidor potente do TPA, da inflamação induzida pelo ácido araquidônico, da atividade da lipoxigenase e ciclo-oxigenase em epiderme de rato. O  $IC_{50}$  de curcumina- dependencia para a inibição desta atividade enzimática era 5-10  $\mu M$ . Neste estudo, os resultados indicaram que a curcumina inibiu o metabolismo epidérmico do ácido araquidônico pelas vias da lipoxigenase e ciclo-oxigenase.

Além disso, Ozaki et al. (2000), examinaram a ação da curcumina na apoptose dos osteoclastos em coelho e demonstraram que a curcumina inibe drasticamente a reabsorção

óssea em paralelo com a estimulação da apoptose nas células. Como o câncer e a inflamação óssea são doenças que aumentam a reabsorção óssea, os autores sugerem que a curcumina pode ser útil na terapia nestas patologias. Braga (2005) relata que existem agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos conhecidos por exercer efeitos antiproliferativo ou citostático por indução da apoptose em células (pré) malignas, como o gingerol e paradol, curcumina e resveratrol.

### **2.1.2.9 Ação Farmacológica da Curcumina**

#### **2.1.2.9.1 Efeito sobre o sistema gastrointestinal**

**Estômago:** O açafrão tem efeito benéfico sobre o estômago. Ele aumenta a secreção de mucina em coelhos e pode assim agir contra a irritação gástrica. Contudo, existe uma controvérsia a respeito da atividade úlcero-gênica da curcumina. Ambos os efeitos, anti-úlcerosa e ulcerogênica, da curcumina têm sido relatados, mas ainda faltam estudos detalhados. A curcumina mostrou proteger o estômago de efeitos ulcerogênicos da fenilbutazona em cobaias de porquinho da Índia na dose de 50 mg/kg. Também protege de ulceração induzida por 5-hidroxitriptamina com a uma dose de 20 mg/kg. Contudo, quando a curcumina foi utilizada a 0,5%, não conseguiu proteger de úlcera contrainduzida por histamina. Na verdade, em doses mais elevadas que 50 mg/kg e 100 mg/kg, produz úlceras em ratos. Embora o mecanismo ainda não esteja claro, um aumento do ácido gástrico e/ou a secreção de pepsina e redução no conteúdo de mucina têm sido implicado na indução da úlcera gástrica. Estudos recentes em laboratório indicam que a curcumina pode bloquear a indometacina, o etanol e a úlcera gástrica induzida por estresse pode também impedir a ligadura induzida do piloro por secreção de ácido em ratos. O efeito anti-úlcerosa é mediado pela eliminação de espécies reativas de oxigênio pela curcumina (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

**Intestino:** A curcumina têm bons efeitos sobre o intestino também. A atividade antiespasmódica do Curcuminato de sódio foi observada em íleum de cobaia de porquinho da Índia. A atividade antiflatulência também foi observada em experimentos in vivo e in vitro, em ratos. A curcumina também aumenta a atividade intestinal da lipase, da sacarase e da maltase (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

**Fígado:** A curcumina e os seus análogos têm atividade protetora em hepatócitos de rato em cultura contra o tetracloreto de carbono, D-galactosamina, peróxido e toxicidade induzida por ionóforo. A curcumina também protegeu contra alterações induzidas por dietilnitrosamina e 2-acetilaminofluoreno no desenvolvimento de focos hepáticos. Foi relatado o aumento da produção de bÍlis em cães pela curcumina e o óleo essencial de *C. longa* (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

**Pâncreas:** O 1-fenil-1-hidroxi-n-pentano, derivado sintético de p-acetilmetilcarbinol (um ingrediente de *C. longa*) aumenta a secreção plasmática e níveis de bicarbonato. A curcumina também aumenta a atividade da lipase pancreática, amilase, tripsina e quimiotripsina (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.9.2 Efeito sobre o Sistema Cardiovascular**

A curcumina diminui a gravidade das alterações patológicas e, portanto, protege contra os danos causados por infarto do miocárdio. A curcumina melhora o transporte de  $Ca^{2+}$  e o seu resvalamento a partir do retículo endoplasmático do músculo cardíaco, aumentando assim a possibilidade de intervenções farmacológicas para corrigir o defeito da homeostase de  $Ca^{2+}$  no musculo cardíaco. A curcumina tem efeito hipocolesterémico significativo em ratos hipercolesterêmicos (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.9.3 Efeito sobre o Sistema Nervoso**

A curcumina e o complexo de manganês da curcumina oferecem uma ação protetora contra a demência vascular, exercendo atividade antioxidante (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.9.4 Efeito no Metabolismo Lipídico**

A curcumina reduz a lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminui a lipoproteína de baixa densidade no plasma e de forma significativa o nível total de colesterol no fígado, promovendo um aumento do nível de  $\alpha$ -tocoferol no plasma de ratos, sugerindo uma interação

in vivo entre a curcumina e o  $\alpha$ -tocoferol, que podem aumentar a biodisponibilidade da vitamina E e a diminuição do nível de colesterol. A curcumina liga-se com a fosfatidilcolina, provenientes de ovos e de soja, que por sua vez se liga a íons de metais bivalentes para oferecer atividade antioxidante. O aumento no teor em ácidos graxos após a indução de danos no fígado pelo etanol é significativamente diminuída pelo tratamento com curcumina e o nível de ácido araquidônico aumenta (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

### 2.1.2.10 Outras Atividades do Açafrão e da Curcumina

A curcumina e o seu sal de sódio têm demonstrado uma forte atividade anti-inflamatória em edema induzido por carragenina e caoline. O açafrão em pó protege a mucosa gástrica contra substâncias irritantes. A curcumina pode diminuir o nível de colesterol elevado como estatina e tem atividade antimutagenica (SCARTEZZINI; SPERONI 2000). Chuang et al. (2000) mostraram que a curcumina, em concentrações de 200 mg/kg ou 600 mg/kg pode eficazmente inibir inflamação do fígado induzida por dietilnitrosamina em ratos. Outra ação interessante desta substância foi demonstrada por Park e colaboradores (2000), quando uma injeção intraperitoneal de tetracloreto de carbono induziu uma hepatotoxicidade aguda em ratos. Depois estes animais foram tratados com a curcumina e os resultados mostraram que a lesão do fígado foi inibida.

Silva Filho et al. (2009) fizeram um ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* e com o caramujo *Biomphalaria glabrata* (este caramujo é o portador intermediário do trematóide *Schistosoma mansoni*, causador da doença esquistossomose em humanos) usando a óleoresina extraída com acetona de rizomas da *C. longa* e o óleo essencial do rizoma da *C. longa* (OERCL). Concluíram que a óleoresina tem a presença de curcuminóides, compostos bioativos fenólicos e possui a ação de prevenir certas doenças. A óleoresina e o OERCL apresentaram toxicidade sobre *A. salina* nas concentrações de 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As concentrações letais de 50% referentes à óleoresina e ao OERCL evidenciaram que ambos os extratos possuem princípios ativos ou bioatividades através de seus constituintes, além disso ambos os extratos podem constituir uma alternativa no controle da população destes caramujos e na redução da esquistossomose.

Leung e colaboradores (2015) testaram a nanoencapsulação de curcumina em nanoemulsão onde a parte hidrofílica da curcumina se liga à água dando estabilidade à nanoemulsão exibindo três propriedades importantes: (1) uma região hidrofóbica para

encapsular a curcumina; (2) uma superfície hidrofílica para manter a suspensão estável em água e (3) uma efetiva segregação de curcumina com as moléculas de água ao redor. Irandhahi et al. (2015) afirmam que a curcumina possui interações não covalentes hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, o que faz com que a curcumina tenha uma grande seletividade de alvos específicos e múltipla ação para ser aplicada em vários tipos estudos clínicos.

#### **2.1.2.10.1 Atividade Pro/Antimutagênica**

A curcumina exerce efeitos pró e antimutagênicos. Em doses de 100 e 200 mg/kg de peso corporal, a curcumina mostrou reduzir o número de células com aberrações cromossômicas induzida por ciclofosfamida em ratos Wistar. O açafrão também impede a mutação em modelos uretano (um potente mutagênico). Relatos contraditórios também existem. A curcumina e o açafrão induzem aberrações cromossômicas por radiação  $\gamma$  em ovário de hamster chinês. A curcumina também tem demonstrado não proteger a quebra de cadeia de DNA induzida pelo cromo hexavalente. De fato, ao efeito total do cromo a curcumina é um aditivo causando quebras no DNA de linfócitos humanos e células da mucosa gástrica (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.10.2 Atividade Anticoagulante**

A curcumina mostra a atividade anticoagulante pela inibição do colágeno que por sua vez inibe a adrenalina de induzir a agregação de plaquetas, in vitro bem como in vivo, em aorta torácica de ratos (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.10.3 Atividade Antifertilidade**

Extratos aquosos de rizomas de cúrcuma e de éter de petróleo mostram 100% de efeito antifertilidade em ratos quando administrados oralmente. A nidação é completamente inibida por estes extratos. A curcumina inibe a  $5\alpha$ -redutase, que converte a testosterona a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, inibindo assim o crescimento do flanco dos órgãos de hamster. A curcumina também inibe a motilidade do esperma humano e tem o potencial para o desenvolvimento de um contraceptivo intravaginal (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.10.4 Efeito Antidiabético**

A Curcumina impede a formação de cataratas induzidas por galactose, a doses muito baixas. O açafrão e a curcumina diminuem o nível de açúcar no sangue de ratos diabéticos. A curcumina também diminui complicações avançadas de relacionadas à glicose em portadores da diabetes mellitus (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.1.2.10.5 Efeito Antifibrótico**

A curcumina suprime a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em ratos. A administração oral de curcumina em doses de 300 mg/kg inibe o aumento de células com fibrose induzidas por bleomicina, a contagem total e os biomarcadores de respostas inflamatórias. Também suprime a produção de macrófago alveolar induzida por bleomicina de TNF- $\alpha$ , o superóxido e o óxido nítrico. Assim curcumina atua como um agente anti-inflamatório e antifibrótico potente (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

### **2.2 Estudos Farmacocinéticos sobre a Curcumina**

A curcumina, quando administrada por via oral ou por via intraperitoneal em ratos, é eliminada principalmente pelas fezes e apenas um pouco na urina. Apenas traços de curcumina são encontrados no sangue do coração, fígado e rim. A curcumina, quando adicionada a hepatócitos isolados é rapidamente metabolizada e os principais metabólitos biliares são glicuronídeos de tetra-hidrocurcumina e hexahidrocurcumina. A curcumina, depois de metabolizada no fígado, é excretada principalmente através da bile (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.2.1 Estudos Clínicos e Aplicações Medicinais do Açafrão e da Curcumina**

Embora vários estudos têm sido realizados com extratos de açafrão e alguns de seus ingredientes em vários modelos animais, apenas alguns estudos clínicos são relatados:

##### **2.2.1.1 Açafrão**

O rizoma em pó é usado para tratar feridas, contusões e articulações inflamadas no Nepal. Na tradicional medicina indiana, é utilizado para o tratamento de distúrbios das vias

biliares, anorexia, tosse, feridas relacionadas à diabetes, perturbações hepáticas, reumatismo e sinusites. Os dados disponíveis também mostram que o pó, quando aplicado na forma de cápsulas em pacientes com doença respiratória, dá alívio de sintomas como dispnéia e tosse. Um ensaio clínico com 18 pacientes com artrite reumatóide definitiva mostraram significativa melhoria na rigidez matinal e edema articular depois de duas semanas de tratamento com doses orais de 120 mg/dia. A aplicação do pó em combinação com outros produtos vegetais também é relatado para a purificação de sangue e para problemas menstruais e abdominais (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.2.1.2 Curcumina**

Em doentes submetidos a cirurgia, a aplicação oral da curcumina reduz a inflamação pós-operatória. Recentemente, a curcumina foi formulada para uma liberação lenta como microesferas biodegradáveis para o tratamento de inflamação em doenças artríticas em ratos. Este estudo que usa a curcumina em microesferas biodegradáveis pode ser empregado com sucesso para a gestão terapêutica de inflamação (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

#### **2.2.2 Avaliação da Segurança do Açafrão e da Curcumina**

Estudos detalhados têm sido relatados na avaliação da segurança dos rizomas de *C. longa*, seu extrato alcoólico e a curcumina. Os principais resultados são apresentados abaixo:

##### **2.2.2.1 Açafrão**

O consumo médio de açafrão por asiáticos varia de 0,5 para 1,5 g/dia /pessoa e não produz nenhum sintoma tóxico. Ratos Wistar machos e fêmeas, porquinhos da Índia e macacos foram alimentados com doses muito mais altas de açafrão (2,5 g/kg de peso corporal) que normalmente é consumida por seres humanos. Nenhuma mudança foi observada na aparência e no peso de rim, fígado e coração. Além disso, não foram notadas anomalias patológicas ou comportamentais e não foi observada mortalidade (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

##### **2.2.2.2 Curcumina**

A curcumina foi administrada em ratos Wistar, porquinhos da Índia e macacos de ambos os sexos, com uma dose de 300 mg/kg de peso corporal. Nenhuma anomalia patológica, comportamental ou letalidade foram observadas. Não foram observados efeitos adversos no crescimento e o nível de eritrócitos, leucócitos e constituintes do sangue tais como a hemoglobina, a proteína sérica total, alcalino fosfatase, etc. Ensaio clínico humano

também indicam que a curcumina não tem nenhuma toxicidade quando administrado em doses de 1-8 g/dia e 10 g/dia (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

### **2.2.3 Perspectivas Futuras**

O açafrão tem sido usado na medicina ayurvédica desde a antiguidade com diversas aplicações biológicas. Embora o extrato bruto tenha numerosas aplicações medicinais, aplicações clínicas podem ser feitas somente após uma extensa pesquisa sobre a sua bioatividade, mecanismo de ação, fármaco terapêuticos e estudos de toxicidade. Contudo, como a curcumina já está disponível na forma pura, e que mostra um amplo espectro de atividades biológicas, poderia ser mais fácil de desenvolver novas drogas a partir deste composto depois de extensivos estudos sobre o seu mecanismo de ação e efeitos farmacológicos. Nos últimos anos houve um aumento entusiasmático no tratamento de várias doenças com produtos naturais (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

A curcumina não é tóxica, é um composto altamente promissor, antioxidante natural, tem um amplo espectro de funções biológicas. Espera-se que a curcumina possa achar aplicação como um novo medicamento num futuro próximo para controlar várias doenças, incluindo doenças inflamatórias, carcinogênese e patogênese induzida pelo estresse oxidativo (CHATTOPADHYAY et al. 2004).

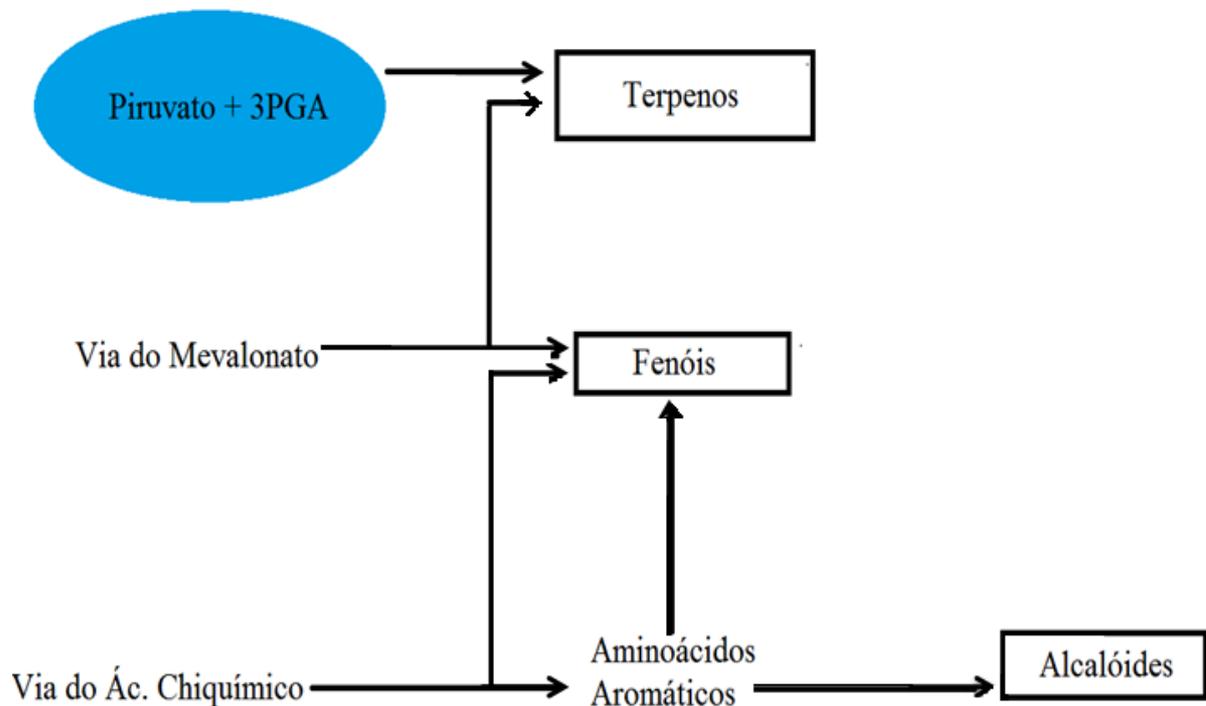
### **2.3 Metabolismo Secundário**

O metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham um a função essencial no vegetal como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas sendo os aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e a clorofila. O metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois, não são necessários para todas as plantas (CASTRO et al., 2005).

Esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos (quimiosistemática). Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete o seu ciclo de vida, ele desempenha papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, são os fatores bióticos. Os produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como os polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbiotes. Também

possuem a ação protetora em relação a estresses abióticos associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios UV e de deficiência de nutrientes minerais (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

Existem 3 grupos de metabólitos secundários: Terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma), ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) (Figura 9). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (Adaptado de CASTRO et al., 2005).



**Figura 9:** Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.

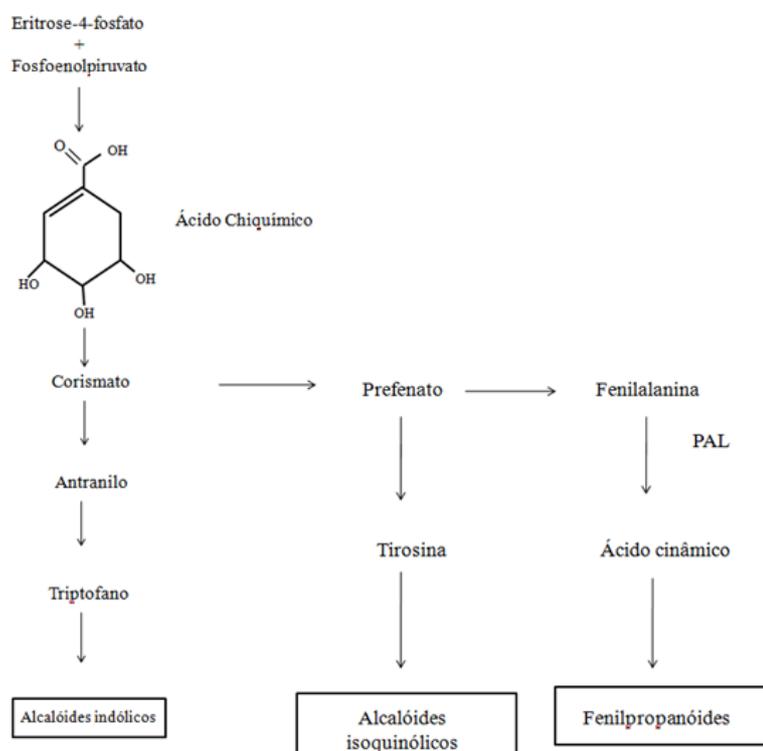
**Fonte:** Castro et al., 2005

### 2.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Os fenóis servem como atrativos de polinizadores e dispersores de semente, protegem as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há inclusive certas espécies vegetais que desenvolvem compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática) (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico, a qual é menos significativa. O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose: fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A formação do ácido corísmico se dá através da junção do ácido chiquímico e uma molécula de fosfoenolpiruvato. O ácido corísmico por sua vez gera os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcalóides. Um dos primeiros grupos de compostos fenólicos formados a partir de ácido corísmico são os fenilpropanóides, compostos que costumam ser voláteis, sendo considerados junto com os monoterpenos, óleos essenciais (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

A principal enzima da via do ácido chiquímico é a fenilalanina amônio liase (PAL). Essa enzima retira uma amônia da fenilalanina formando o ácido cinâmico. A PAL é regulada por fatores ambientais como o nível nutricional, a luz (pelo efeito do fitocromo) e infecção por fungos. Entre as substâncias formadas após a ação da PAL estão o ácido benzóico, que dá origem ao ácido salicílico, importante composto na defesa das plantas contra patógenos. Outra classe de compostos derivados da PAL é representada pelos flavonóides, que estão envolvidos na sinalização entre plantas e outros organismos e na proteção UV (Figura 10) (Adaptado de CASTRO et al., 2005).



**Figura 10:** Via do ácido chiquímico para a biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcalóides. Uma importante enzima nessa via é a fenilalanina amônio liase (PAL) a qual produz o ácido cinâmico.

**Fonte:** Castro et al. (2005)

### 2.3.2 Terpenos

Os terpenos são semelhantes a polímeros como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as proteínas, pois, são formados por monômeros que são moléculas de isopreno (cadeia formada por 5 carbonos) ou isopentenilpirofosfato. Desse modo, os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que entraram em sua montagem. Muitos compostos vegetais importantes são terpenos ou possuem derivados de terpenos em partes de sua molécula, inclusive quatro das seis principais classes de hormônios vegetais (Tabela 2) (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

**Tabela 2:** Principais terpenóides encontrados nas plantas. Notar que os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GAs) e os brassinosteróides (BR).

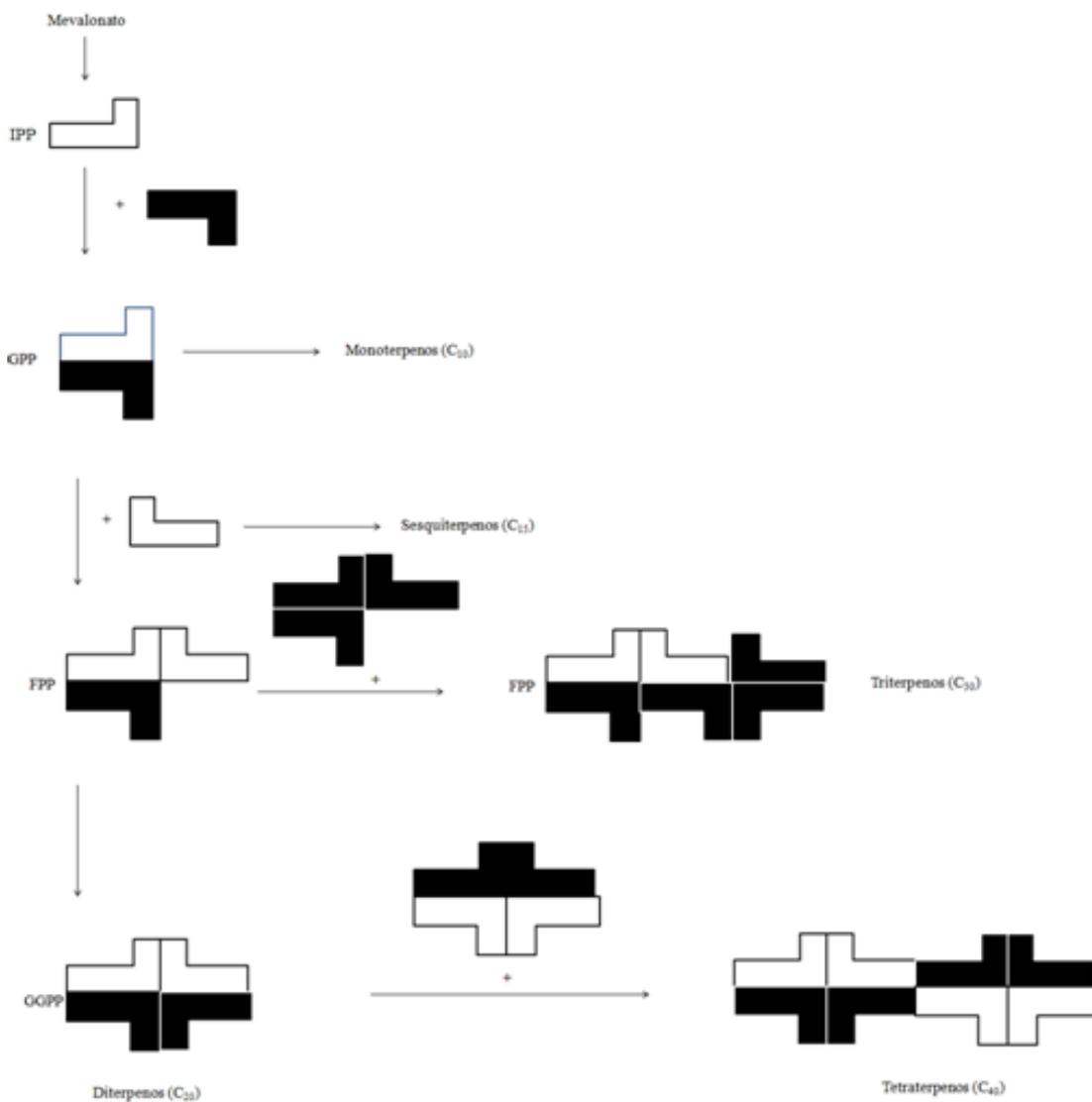
Isoprenos	Átomos de Carbono	Nome	Exemplos
1	5	Isopreno	Cadeia lateral das CKs
2	10	Monoterpeno	Piretróides e óleos essenciais
3	15	Sesquiterpeno	ABA, lactonas
4	20	Diterpeno	GAs, taxol
6	30	Triterpeno	Esteróides (BR), saponinas
8	40	Tetraterpeno	Carotenóides
N	N	Polisopreno	Borracha

Fonte: Castro et al. (2005)

Os terpenos são montados através da justaposição sucessiva de unidades de 5 carbonos denominado isopentenilpirofosfato (IPP). O IPP é derivado do ácido mevalônico ou mevalonato (Figura 11) e dá origem a todos os outros terpenos. Os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) são montados pela adição de uma molécula C5 de cada vez, os triterpenos (C30) são o resultado a junção de duas moléculas C15 (FPP) e os tetraterpenos de duas moléculas de C20 (GGPP) (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

Os monoterpenos devido ao seu baixo peso molecular, costumam ser substâncias voláteis, sendo denominados óleos essenciais ou essências. Contudo nem todos os óleos voláteis são terpenóides. Os monoterpenos podem ocorrer em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Eles podem estar estocados em flores, folhas ou nas cascas dos caules, madeiras e frutos.

Muitos sesquiterpenóides também são voláteis e estão envolvidos na defesa contra pragas e doenças. Os diterpenos normalmente estão associados às resinas de muitas plantas, contudo o principal papel dos diterpenos seja o das giberelinas, que são importantes hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais. Entre os triterpenos estão as saponinas e uma importante classe de substâncias: os esteróides, os quais são componentes dos lipídeos de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdisteróides), os tetraterpenos mais famosos são os carotenos e as xantofilas que participam da captação de luz nos fotossistemas, portanto na fotossíntese. Os carotenos são precursores da vitamina A em humanos, importante antioxidante e dissipador de radicais livres. O último grupo de terpenóides é o composto pelos polisoprenos, entre estes compostos está a borracha: um terpeno formado por 1500 a 15000 unidades de isopreno (Adaptado de CASTRO et al., 2005).



**Figura 11:** Biossíntese de terpenos. O isopreno é representado aqui como uma unidade básica, semelhante aos bloquinhos do brinquedo “lego”. A junção de duas unidades de isopreno ou isopentenilpirofosfato (IPP) forma o geranylpirofosfato (GPP), o qual é precursor dos monoterpênicos, a adição de mais um IPP gera o farnesilpirofosfato (FPP) o qual origina os sesquiterpenos. A adição de mais um IPP a um FPP origina o geranylpirofosfato (GGPP), sendo este o precursor dos diterpenos. A junção de dois FPPs dá origem aos triterpenos. De modo semelhante, são precisos dois GGPPs para a obtenção de um tetraterpeno.

**Fonte:** Castro et al. (2005).

### 2.3.3 Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de hidrogênio no seu anel. Na sua grande maioria os alcalóides possuem caráter alcalino, já que a presença do átomo de N (Nitrogênio) representa um par de elétrons não compartilhados. Contudo existem alcalóides de caráter ácido. Os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos, não aparecendo em células jovens. Essa classe de compostos do metabolismo secundário está repleta de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas usadas como remédios, tropânicos, analgésicos, veneno e alucinógenos (Adaptado de CASTRO et al., 2005).

Os alcalóides são caracterizados pela presença de N em moléculas orgânicas, quase a totalidade dos alcalóides é derivada de aminoácidos, como a ornitina, a lisina, a tirosina e o triptofano. A ornitina é precursora de alcalóides pirrolidínicos e tropânicos, a lisina dá origem aos alcalóides piperidínicos. A tirosina e o triptofano são formados na via do ácido chiquímico e dão origem aos alcalóides isoquinolínicos e indólicos (Adaptado de CASTRO et al., 2005). O próximo tópico irá abordar sobre os óleos essenciais, onde se originam nas plantas e como extraí-los.

### 2.4 Óleo essencial

Óleos essenciais (OEs) são 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 sesquiterpenoides, benzenóides, fenilpropanóides, entre outros) exercem sobre os seres humanos, animais e outras plantas (BASER; BUCHBAUER, 2010). 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 et al., 2012).

Os OEs são compostos naturais complexos, caracterizados por um forte odor e são sintetizado por plantas aromáticas como metabólitos secundários (FARIA, 2008). Eles são normalmente obtidos por arraste a vapor ou hidrodestilação, 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 são utilizados na preservação de alimentos, como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, medicamentos anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolítico (BAKKALI et al., 2008; MEDRANO; RODRIGUEZ, 2014).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Estes 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 estas representam uma parte importante da farmacopéia tradicional. Os OEs podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Existem vários métodos para a extração de óleos essenciais e o produto da extração pode variar em qualidade, quantidade e na composição 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 que 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).

#### **2.4.1 Métodos de Obtenção de Óleos Essenciais**

Atualmente existem várias técnicas de extração de OEs, onde podemos citar a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por solventes orgânicos, dentre outros.

#### **2.4.1.1 Hidrodestilação**

A extração por hidrodestilação é um método antigo, simples 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 et al., 2012).

#### **2.4.1.2 Destilação por Arraste a Vapor**

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 et al., 2012).

#### **2.4.1.3 Extração por Solventes Orgânicos**

O processo de extração utilizando solventes orgânicos consiste em 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. A desvantagem deste 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 et al., 2012).

## 2.5 Emulsões

Uma emulsão consiste de dois líquidos imiscíveis (usualmente óleo e água), com um dos dois líquidos disperso em forma de pequenas gotas esféricas no outro (BECHER, 2001). As emulsões podem ser convenientemente classificadas de acordo com a distribuição da quantidade relativa do óleo e da fase aquosa. Um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo-em-água (O/A), enquanto o sistema que consiste de gotas de água dispersas na fase oleosa é chamado emulsão água-em-óleo (A/O).

Em uma emulsão a substância que constitui as gotas é chamada de fase dispersa, fase descontínua ou fase interna e o líquido circundante é chamado fase dispersante, fase contínua ou fase externa.

De acordo com Tadros (2013) as emulsões podem ser classificadas a partir da sua estrutura 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 às macroemulsões, estas 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.

### 2.5.1 Nanoemulsões

Uma nanoemulsão pode ser considerada uma emulsão convencional que contenha partículas muito pequenas. As nanoemulsões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-

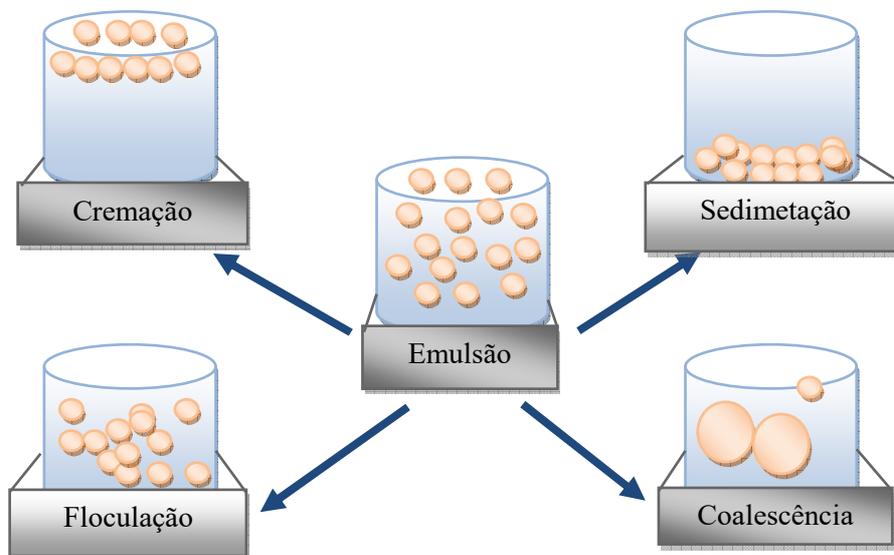
em-óleo (A/O). Uma nanoemulsão óleo-em-água é definida como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável que consiste de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos a ser disperso como pequenas gotas esféricas ( $r < 100$  nm) em outro líquido (MCCLEMENTS, 2012).

Sistemas de entregas coloidais com base em nanoemulsões são cada vez mais utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas para encapsular, proteger e entregar componentes lipofílicos bioativos. 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:

- Apresentam 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 (BECHER 2001);
- Evita 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 (PETSEV et al., 1995; VERWEY; OVERBEEK, 1948);
- Evita a coalescência uma vez que as gotas não são deformáveis e não existem flutuações na superfície. A coalescência é a colisão e conseqüentemente a fusão irreversível de duas gotas e assim sucessivamente onde o fim da coalescência é a completa separação de fases (KABALNOV; WENNERSTROM, 1996);
- 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 12 estão representados os processos de cremação, sedimentação, floculação e coalescência. Esses processos conduzem a instabilidade de uma emulsão (JATO, 1997).



**Figura 12:** Processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão.  
Adaptado de Tadros et al.,2004.

### 2.5.1.1 Formação de Nanoemulsão

Como uma nanoemulsão consiste de um sistema que não se encontra em equilíbrio termodinâmico, a formação da mesma requer a aplicação de energia. Esta energia pode ser aplicada por equipamentos mecânicos ou pelo potencial químico inerente dos componentes (SOLANS et al., 2003).

Sabe-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 (GUPTA; CANNON, 2000; MILLER, 2006).

### 2.5.1.2 Métodos de Obtenção de Nanoemulsão

Existem três métodos que podem ser aplicados para a preparação de nanoemulsões. Eles são o uso de alta pressão de homogeneização, homogeneização ultrassônica e o método de temperatura de inversão de fases (PIT).

#### 2.5.1.2.1 Homogeneizadores de Alta Pressão

Os homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados na indústria para a preparação de nanoemulsões (SOLANS et al., 2003; JAFARI et al., 2006). Geralmente trabalham em um 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. (FLOURY et al., 2003). 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 irreversível das moléculas de cadeia longa.

#### **2.5.1.2.2 Emulsificação Ultrassônica**

A técnica de emulsificação ultrassônica é muito eficiente na redução do tamanho das gotículas, porém sua utilização só é apropriada para lotes pequenos. Um estudo recente na preparação de nanoemulsões poliméricas mostrou que a eficiência do processo de dispersão é fortemente dependente do tempo de ultrassonicação a diferentes amplitudes e que quanto mais hidrofóbico é o monômero, maior é o tempo de sonicação requerido (GUPTA; CANNON, 2000; MILLER, 2006).

O equipamento do ultrassom pode ser utilizado para muitas aplicações e é um método alternativo para produzir 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; CHOW, 2008).

#### **2.5.1.2.3 Método de Temperatura de Inversão de Fases (PIT)**

O método de inversão de fases por temperatura, método PIT introduzido por Shinoda; 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 nanoemulsões água-em-óleo (SHINODA; KUNIEDA, 1983).

### 2.5.2.1 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.

A variação de energia livre associada com a formação da nanoemulsão determina se uma nanoemulsão é ou não termodinamicamente estável, porém não dá 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, 1999).

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 contém 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, 1999).

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 à 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 (GUPTA; CANNON, 2000).

### **2.5.2.2 Potencial Zeta**

A medida do potencial zeta ( $\zeta$ ) está relacionada com o potencial de superfície das partículas, que é diretamente ligado a mudanças na face de interação entre a fase aquosa e a fase oleosa, devido à ocorrência de dissociação de grupos funcionais na fase oleosa ou pela adsorção de espécies iônicas contidas na fase aquosa. A medida deste parâmetro pode ser determinada com o uso de técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICK et al., 2003). Valores altos para o módulo do potencial zeta indicam que as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, tendo como consequência a dispersão uniforme das gotículas no sistema. No entanto, para um valor baixo no módulo do potencial zeta, as forças atrativas irão predominar em relação às repulsivas, possibilitando a aproximação das partículas, o que pode promover a instabilidade das emulsões.

De acordo com Lieberman et al. (1989) os sistemas emulsionados são considerados estáveis quando possuem um valor absoluto maior que 25 mV, de forma que quando o módulo do potencial zeta é maior que 25 mV as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, tendo-se assim um sistema disperso. Já para o módulo do potencial zeta menor que 25 mV as forças atrativas predominam em relação às repulsivas e as partículas se aproximam, gerando a floculação e consequentemente a separação de fases (LIEBERMAN et al., 1988; LIEBERMAN et al., 1989).

O equipamento Zetasizer utiliza uma técnica por meio da qual obtem-se a medição do tamanho, mobilidade eletroforética de proteínas, potencial zeta de nanopartículas e superfícies, e, como opção, microrreologia de soluções de proteínas e polímeros.

### **2.5.2.3 Fatores de Estabilidade das Nanoemulsões**

O tamanho pequeno das gotículas das nanoemulsões confere estabilidade contra sedimentação (ou 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).

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

#### **2.5.2.3.1 Fenômeno de Maturação de Ostwald**

O fenômeno de maturação de Ostwald é 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, 2005).

As nanoemulsões polidispersas e a diferença na solubilidade entre as gotas pequenas e grandes são o principal mecanismo de desestabilização das nanoemulsões (TADROS et al., 2004).

Se existe alguma difusão do 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 foi descrito por Lifshitz; Slyozov (1961). E de maneira independente por Wagner (1961).

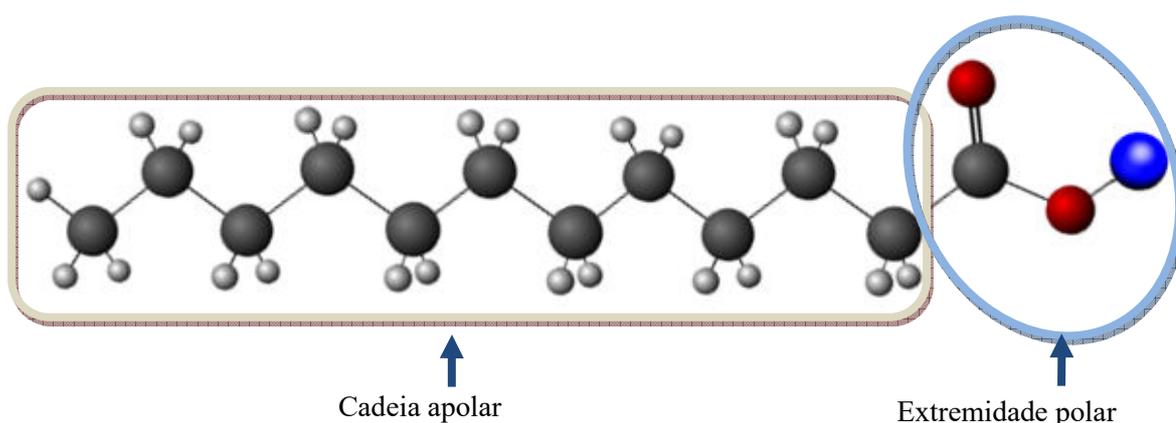
Higuchi; Misra (1962) sugerem que a adição de um componente secundário menos solúvel em água pode diminuir o fenômeno de maturação de Ostwald. A difusão mais lenta do componente secundário levará a uma distribuição heterogênea com as gotas menores enriquecidas no componente menos solúvel e as gotas maiores enriquecidas no componente mais solúvel.

Contudo, esta segregação interna será oposta termodinamicamente à 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 (Taylor, 1998) e em emulsões com fluoretos de carbono (SHARMA et al., 1988; WEERS et al., 1994).

Com um aditivo escolhido apropriadamente, a maturação de Ostwald pode ser efetivamente eliminada (KABALNOV; SHCHUKIN, 1992).

#### **2.5.2.4 Agentes Emulsificantes**

Um aspecto fundamental na formação de nanoemulsões é o uso de emulsificantes, os quais são moléculas com atividade superficial que se adsorvem na superfície das gotas durante a homogeneização, formando uma membrana protetora que previne a agregação das gotas e ainda diminuem a tensão superficial na interface. A maioria dos emulsificantes são moléculas anfifílicas, ou seja, contem regiões polares e apolares na mesma molécula (DICKINSON, 2003) como se mostra na Figura 13.



**Figura 13:** Molécula anfifílica.  
**Fonte:** Dickison (2003)

A estabilidade das nanoemulsões é de vital importância em aplicações industriais. As características desejáveis de um emulsificante podem englobar-se nos seguintes pontos:

- Devem reduzir a tensão interfacial em torno de 5 dinas/cm em emulsões preparadas com agitação (YUAN et al., 2007);
- Devem formar uma película não aderente que não se dilua quando duas gotas colidam, não permitindo a floculação ou a coalescência (KOBAYASHI et al., 2002);
- Deve ter estrutura molecular específica com terminação polar para atrair a água ou terminação apolar para atrair o óleo (SCHRÖEDER; SCHUBERT, 1999);
- Deve ser mais solúvel na fase contínua de forma a adsorver-se rapidamente em torno das gotas da nanoemulsão (WALSTRA; DERKER, 1996);
- Mostrar capacidade para emulsificar o sistema requerido com pequenas concentrações de emulsificante (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 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; 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; SCHRÖEDER; SCHUBERT, 1999).

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 tem aplicações práticas (KOBAYASHI et al., 2002).

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 (KOBAYASHI et al., 2002).

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

#### **2.5.2.4.1 Equilíbrio Hidrófilo 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 na fase aquosa, migre para a interface e se oriente com o grupo hidrofílico na água e o grupo lipofílico na fase oleosa. Griffin (1949) desenvolveu 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.

A Tabela 3 apresenta a classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL conforme descrito por Griffin (1949).

**Tabela 3:** Classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL.

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

**Fonte:** Griffin (1949)

## **2.6 Avaliação da citotoxicidade**

Toda substância, segundo a Toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição (doses únicas ou múltiplas) e via de administração (respiratória, oral, dérmica, parenteral). Desta forma faz-se necessário conhecer as condições de uso das substâncias químicas para a saúde humana e ambiental. Em princípio, se de um lado, todas as substâncias podem ser potencialmente tóxicas, por outro, todas as substâncias podem ser usadas de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância, a exposição deve ser evitada (OGA et al. 2008).

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Para que este dano ocorra é indispensável a interação do agente químico com o organismo. A relação entre a intensidade do efeito, a concentração e o tempo de exposição, depende da idade e das condições de saúde do indivíduo ou organismo exposto. Os efeitos tóxicos produzidos por substâncias químicas em sistemas biológicos só se manifestam se o agente tóxico ou um produto de sua biotransformação alcançar locais específicos do organismo em concentração e tempo suficientes para produzir o efeito. Muitas substâncias químicas são relativamente pouco tóxicas em sua forma nativa, enquanto outras pela ação das enzimas do organismo são convertidas a formas intermediárias que interferem na fisiologia celular. A ocorrência da resposta tóxica é, portanto, dependente das propriedades químicas e físicas da substância, da condição de exposição e da susceptibilidade do sistema biológico ou do indivíduo (adaptado de OGA et al. 2008).

Para avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *C. longa* e as nanoemulsões preparadas com ambos os óleos essenciais foi realizado o teste com células de macrófagos de camundongos da linhagem J774.

## 2.7 Análises Espectroscópicas

A espectrometria se baseia na absorção de energia eletromagnética por moléculas. Referida absorção varia tanto em relação à concentração como em relação à estrutura das moléculas analisadas (BRASIL, 2010).

A energia eletromagnética absorvida no procedimento da espectrofotometria consiste em uma radiação que se propaga por meio de ondas, subdividindo-se em faixas de comprimento de ondas. Além disso, esta radiação também é definida como um fluxo de fótons, que contém energia cuja intensidade é proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda (BRASIL, 2010).

O comprimento de onda ( $\lambda$ ) de uma radiação eletromagnética é expressa em unidade de nanômetro ( $\text{nm} = 10^{-9}$ ) ou micrômetros ( $\mu\text{m} = 10^{-6}$ ). Já no espectro infravermelho, a radiação eletromagnética pode ser descrita em número de ondas representada por  $\text{cm}^{-1}$  (BRASIL, 2010).

Descrevem-se na Tabela 4 as faixas de comprimento de onda de energia eletromagnética que importam para a espectrofotometria.

**Tabela 4**– Regiões do comprimento de onda de importância da espectrofotometria

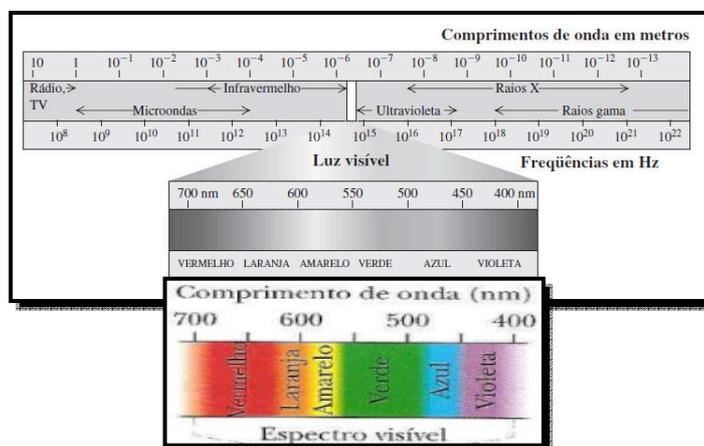
<b>Região</b>	<b>Faixa de comprimento de onda</b>
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm (12800 – 4000 $\text{cm}^{-1}$ )
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 $\mu\text{m}$ (2500 – 400 $\text{cm}^{-1}$ )
Infravermelho distante	25 – 300 $\mu\text{m}$ (400 – 33 $\text{cm}^{-1}$ )

Fonte: Adaptado de Brasil, 2010

A Espectrofotometria pode ser realizada por quatro técnicas distintas, quais sejam: Ultravioleta Visível (UV-Vis), Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF), Ressonância Magnética Nuclear - RMN (não será analisada no presente trabalho) e Cromatografia Gasosa acoplada da Massa (CG-EM). As três primeiras técnicas utilizam a

energia eletromagnética na interação com as moléculas, já a última (CG-EM) utiliza uma fonte ionizada na interação (MCMURRY, 2004).

As técnicas de espectrometria dependem da natureza da energia radiante do espectro eletromagnético. O espectro eletromagnético compõe-se de diferentes tipos de radiação eletromagnética caracterizadas pelo comprimento e frequência da onda (Figura 14).



**Figura 14** – Espectro eletromagnético.  
Adaptado de: (YOUNG et al., 2008; WALKER et al., 2009)

De acordo com as características da onda, o espectro eletromagnético se divide em regiões, sendo que a região do visível corresponde a uma pequena porção do espectro, localizada em uma faixa entre 380 nm a 780 nm de comprimento de onda, entre o ultravioleta e o infravermelho (MCMURRY, 2004).

A radiação eletromagnética quando em contato com uma substância pode ser absorvida ou transmitida pelas moléculas, conforme o comprimento de onda. Para se determinar o espectro de absorção de uma amostra é necessário identificar quais comprimentos de onda são absorvidos pela molécula e quais são transmitidos (MCMURRY, 2004).

### 2.7.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

A técnica de espectroscopia por Infravermelho informa quais grupos funcionais estão presentes na amostra estudada. A espectroscopia IV corresponde à região do espectro eletromagnético localizado entre a faixa do visível e as micro-ondas, isto é, entre 4000 até 400  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN, 2013).

Cada molécula possui uma quantidade de energia em sua estrutura traduzindo-se em uma constante vibração molecular. Quando a molécula absorve a radiação IV na faixa entre

10000 a  $100\text{ cm}^{-1}$ , esta se transforma em energia de vibração molecular, processo denominado *quantização*, ou seja, a molécula pode ser deformada axialmente (vibração ao longo do eixo de ligação) ou angularmente (vibração de um grupo de átomos em relação à molécula) (MCMURRY, 2004; SILVERSTEIN, 2013).

Neste sentido, considerando que cada grupo funcional possui uma combinação específica de ligações, cada um possuirá um grupo característico de absorção de energia no infravermelho. Assim, identificando-se quais frequências são absorvidas e quais não são, é possível determinar os grupos funcionais contidos na molécula (MCMURRY, 2004; BRASIL, 2010; SILVERSTEIN, 2013).

Na região do infravermelho o comprimento de onda é dado em micrômetros ( $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$ ) e a frequência em número de ondas ( $\tilde{\nu}$ ), que é o inverso do comprimento de onda em centímetros, por isso expresso em  $\text{cm}^{-1}$ , portanto, o número de ondas é definido pela equação 1.

$$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} \quad (1)$$

Já a relação de intensidade de energia se apresenta como Tramitância ( $T$ ) ou Absorbância ( $A$ ). A Tramitância é obtida pela razão entre a energia radiante transmitida pela molécula e a energia radiante incidente e a absorbância é o logaritmo decimal do inverso da Tramitância, isto é expresso pela equação 2:

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

A espectroscopia também é realizada conjugada uma técnica específica denominada Transformação de Fourier (TF), que utiliza dois feixes, um fixo e outro móvel, o que permite a variação da distância entre os feixes, possibilitando variação na intensidade de radiação recebida pelo detector, chamado interferograma. Neste processo o resultado obtido apresenta-se em unidade de tempo e a TF converte para unidade de frequência (SILVERSTEIN, 2013).

## 2.7.2 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A técnica da espectroscopia por ultravioleta (UV) determina a estrutura de sistemas conjugados, conhecidos como dienos (que contém ligações duplas e simples alternadas). A

luz ultravioleta irradiada sobre tais estruturas provoca a absorção de energia pela molécula, na qual um elétron  $\pi$  é promovido de um orbital molecular ocupado (ligante) para outro desocupado (antiligante  $\pi^*$ ) de menor energia. A energia absorvida corresponde à quantidade necessária para a promoção eletrônica entre os orbitais. Tendo em vista que o elétron é promovido de um orbital molecular ligante  $\pi$  para um orbital molecular antiligante  $\pi^*$  e esta ligação é representada por  $\pi \rightarrow \pi^*$  e ocorre na parte da molécula denominada cromóforos (MCMURRY, 2004; BRASIL, 2010).

As medidas de absorção da radiação pela amostra possui fundamento na Lei de Lambert-Beer e são calculadas a partir da equação 3 (ROCHA et al., 2004).

$$A = \frac{I_o}{I} \quad (3)$$

Onde,

$I_o$  = intensidade de luz incidente

$I$  = intensidade de luz transmitida através da amostra

Já a absorvidade molar é uma constante física, característica específica do sistema eletrônico da amostra analisada e é calculada pela equação 4:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \times l} \quad (4)$$

Onde,

$A$  = Absorbância

$c$  = Concentração em mol.L<sup>-1</sup>.

$l$  = comprimento do caminho óptico da amostra em cm

Os espectros de UV são considerados simples, encontrando-se apenas um pico, que, geralmente, é largo e em seu todo anota-se  $\lambda_{max}$  (lâmbda máximo) (MCMURRY, 2004; BRASIL, 2010).

### **2.7.3 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**

A cromatografia gasosa é um método analítico de separação de elementos que compõem uma amostra, de acordo com as diferentes interações dos elementos com o gás de

arraste (fase móvel) que se move através da fase estacionária (amostra) contida em uma coluna. O gás de arraste circula pela coluna com fluxo e pressão controlados e segue diretamente para o detector. Com o procedimento os compostos são identificados, qualificados e quantificados (MCMURRY, 2004; BRASIL, 2010).

Tal procedimento possui como objetivo identificar a estrutura das moléculas (estruturas orgânicas) no que se refere ao tamanho e fórmula das mesmas (MCMURRY, 2004).

A espectrometria de massas utilizada de forma acoplada à cromatografia gasosa permite que os componentes da amostra sejam convertidos em íons gasosos onde suas massas podem ser detectadas (MCMURRY, 2004; BRASIL, 2010).

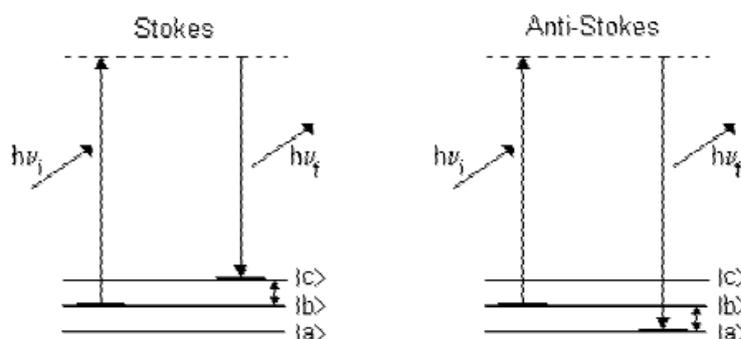
Neste procedimento, inicialmente as moléculas, na fase gasosa, são ionizadas (método de ionização) através do bombardeamento de um feixe de elétrons de alta energia (impacto de elétrons – IE), a partir de então os íons, fragmentados, se reorganizam de forma magneticamente de acordo com a relação massa-carga ( $m/z$  – método de separação de íons). A molécula ionizada é denominada *ion molar* ( $M^+$ ). Assim, o espectro é formado pelo número de íons gerados na separação de cada unidade de massa-carga (MCMURRY, 2004; SILVERSTEIN, 2013).

#### **2.7.4 Espectroscopia Raman**

Uma técnica muito utilizada no estudo da estrutura de sistemas moleculares é a espectroscopia Raman. Ao nível molecular a radiação pode interagir com a matéria por processos de absorção ou de espalhamento, e este último pode ser elástico ou inelástico. O espalhamento elástico de fótons pela matéria é chamado de espalhamento Rayleigh, enquanto o espalhamento inelástico, relatado pela primeira vez em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Vankata Raman, é chamado de espalhamento Raman. No espalhamento inelástico de luz a componente de campo elétrico do fóton espalhado perturba a nuvem eletrônica da molécula e pode ser entendido como um processo de excitação do sistema para um estado “virtual” de energia (JUNIOR, 2002).

Em ambos os casos a diferença de energia entre os fótons espalhado e incidente é chamada de deslocamento Raman e corresponde a diferenças de níveis de energia específicos da amostra em estudo. Dependendo se o sistema perde ou ganha energia de vibração (ou de rotação) a frequência do deslocamento Raman se dá acima e/ou abaixo da energia do fóton

espalhado, em relação ao fóton incidente. As componentes deslocadas para baixo e para cima são chamadas de Stokes e anti-Stokes (Figura 15), respectivamente.



**Figura 15:** Esquema dos níveis de energia moleculares nos processos de espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes.

**Fonte:** Junior (2002).

Um gráfico do número de fótons espalhados detectados (ou da intensidade de luz espalhada) versus o deslocamento Raman em torno de um comprimento de onda laser incidente dá o espectro Raman. Isto pode ser medido, também, diretamente em função do comprimento de onda.

## 2.8 Microbiologia: Bactérias Analisadas

A microbiologia consiste no estudo biológico de organismos microscópicos, dentre os quais encontram-se as bactérias, que são micro-organismos (geralmente menores do que 8 micrômetros) simples, unicelulares, procarióticos. As bactérias são seres que se desenvolvem em variados tipos de meio (ar, água, solo, mar e até em outros seres vivos) e possuem importância para a vida humana, pois, são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, podem provocar doenças, podem ser utilizadas em processos industriais, em Engenharia Genética e em Biotecnologia.

As bactérias são classificadas de acordo com a sua forma: cocos, bacilos e espiroquetas. Algumas bactérias apresentam forma variável e são denominadas pleomórficas. A forma de uma bactéria é determinada pela presença de uma parede celular rígida. A aparência da bactéria ao microscópio é um dos critérios mais importantes para a sua identificação. Além das formas características, a organização também é importante. Por exemplo, certos cocos ocorrem aos pares (diplococos), alguns em cadeias (estreptococos) e outros em forma de cachos de uva (estafilococos). Esta organização é determinada pela

orientação e pelo grau de ligação da bactéria no movimento celular (adaptado de LEVINSON; JAWETZ, 2005).

A parede celular é uma estrutura com camadas múltiplas localizada externamente à membrana citoplasmática. É composta por uma camada interna de peptidoglicano envolta por uma membrana externa, que varia em espessura e em composição química dependendo do tipo de bactéria. O peptidoglicano proporciona o suporte estrutural e mantém a forma característica da célula (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

A estrutura, a composição química e a espessura da parede celular diferem em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A camada de peptidoglicano é muito mais espessa nas bactérias Gram-positivas que nas bactérias Gram-negativas. Algumas bactérias Gram-positivas também possuem uma camada de ácido teicóico, que se projeta para o exterior do peptidoglicano, enquanto as bactérias Gram-negativas não as possuem. Os organismos Gram-negativos possuem uma camada externa complexa, composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípídeos. Nas bactérias Gram-negativas entre a membrana citoplasmática e o peptidoglicano está o espaço periplasmático, no qual se localizam, em algumas espécies, as enzimas denominadas  $\beta$ -lactamases, que degradam as penicilinas e outras drogas  $\beta$ -lactâmicas (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

As bactérias que causam doenças são as patogênicas, sendo foco de muitos estudos, tendo em vista a necessidade de encontrar-se substâncias que inibam seu desenvolvimento ou proliferação, possibilitando o controle sobre as mesmas e a redução das patologias por elas causadas.

Assim, analisar a atividade microbiológica de determinados princípios ativos, consiste em observar se a substância terá alguma ação contra o desenvolvimento dos micro-organismos testados. Dentre os exemplos de bactérias patogênicas estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que neste estudo farão parte do teste de atividade antibacteriana dos óleos essenciais extraídos de *C. longa* e das nanoemulsões produzidas com ambos os óleos.

### 2.8.1 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria pertencente à família *Micrococcaceae*, que se apresenta em forma de cocos Gram-positivos, com tamanho entre 0,5 a 1,5  $\mu$ m e ficam isoladas ou agrupadas em cachos. As colônias, geralmente apresentam-se de forma opaca,

convexa, cremosa e, a depender da espécie, sua cor varia entre o branco e tons de amarelo (ANDRADE, 2013).

A *Staphylococcus aureus* costuma ser encontrada na pele e mucosas dos seres humano e são causadoras de diversas infecções quando invadem o corpo por meio de cortes, como infecções na pele, terçol, furúnculo, foliculite. Outro meio de propagação dessas bactérias que atingem o ser humano são alimentos que, quando contaminado com a referida bactéria ocorre a produção de toxinas que, quando ingeridas podem causar vômitos, náuseas e diarreia (ALENCAR, 2013; ANDRADE, 2013).

### **2.8.2 *Streptococcus pneumoniae***

A *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva (LEVINSON; JAWETZ, 2005), cujo ciclo de vida é desenvolvido na nasofaringe do homem, e lá permanece sem causar problemas até que passe para outros nichos de outro hospedeiro ou do mesmo hospedeiro, podendo, então, causar a pneumonia, uma das doenças infecciosas mais perigosas (SERRANO, 2007).

### **2.8.3 *Escherichia coli***

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa (LEVINSON; JAWETZ, 2005), com capacidade de tolerar ambientes ácidos, o que lhe permite hospedar-se no trato intestinal, podendo provocar doenças em humanos e animais, como, por exemplo, a diarreia. Além disso, esta bactéria também pode atingir o ser humano por meio da ingestão de alimentos contaminados como a carne, leite e derivados, também podem causar infecções urinárias, inflamação generalizada e meningite (ANDRADE, 2013).

### **2.8.4 *Klebsiella pneumoniae***

A bactéria denominada como *Klebsiella pneumoniae*, bactéria Gram-negativa (LEVINSON; JAWETZ, 2005), popularmente conhecida como KPC, pois, produz carbapenemase, é um microrganismo multirresistente, encontrado em ambientes hospitalares, que possui a propriedade de inibir a ação de antibióticos carbapenêmicos, reduzindo as opções de tratamento disponíveis. Esta bactéria é transmitida pelo contato direto com secreções e

excreções dos pacientes ou pela partilha de objetos ou ainda por meio dos profissionais de saúde que manipulam os equipamentos e pacientes sem os devidos cuidados (OLIVEIRA, 2011).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Balança eletrônica**

Para aferir a massa das folhas frescas e secas de *Curcuma longa* L., bem como os rizomas frescos e secos, foi utilizada uma balança eletrônica marca AND, A&D Company Limited, modelo FX3000i, com visor de cristal líquido, carga máxima de 3200 g, sensibilidade de 0,01 g, reprodutibilidade 0,01g, campo de tara: a capacidade mediante subtração, tempo de estabilização  $\leq 3$  s.

##### **3.1.2 Estufa Microprocessada de Secagem**

Para secagem das folhas e rizomas foram utilizadas duas estufas microprocessadas de secagem da marca Nova Ética, modelo 420/1DE, com duas bandejas de tela de aço inoxidável e com circulação de ar. A temperatura e tempo foram controlados.

##### **3.1.3 Moinho tipo faca**

Para trituração das folhas e rizomas, após secagem em estufa, foi utilizado um triturador fixo modelo moinho tipo faca com peneira cilíndrica, em aço inoxidável, nas dependências da Unidade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Acre (UTAL)/UFAC.

##### **3.1.4 Hidrodestilador**

Para obtenção dos Óleos Essenciais de *Curcuma longa* L. (OECL) foi utilizado um aparelho tipo Clevenger modificado, junto com um balão de fundo redondo de 5.000 mL de capacidade, uma manta aquecedora e um bebedouro modificado para refrigeração.

##### **3.1.5 Balança eletrônica de precisão**

Para a aferição de massa dos materiais no preparo da nanoemulsão foi utilizada uma balança eletrônica de precisão da marca Shimadzu, modelo AY220.

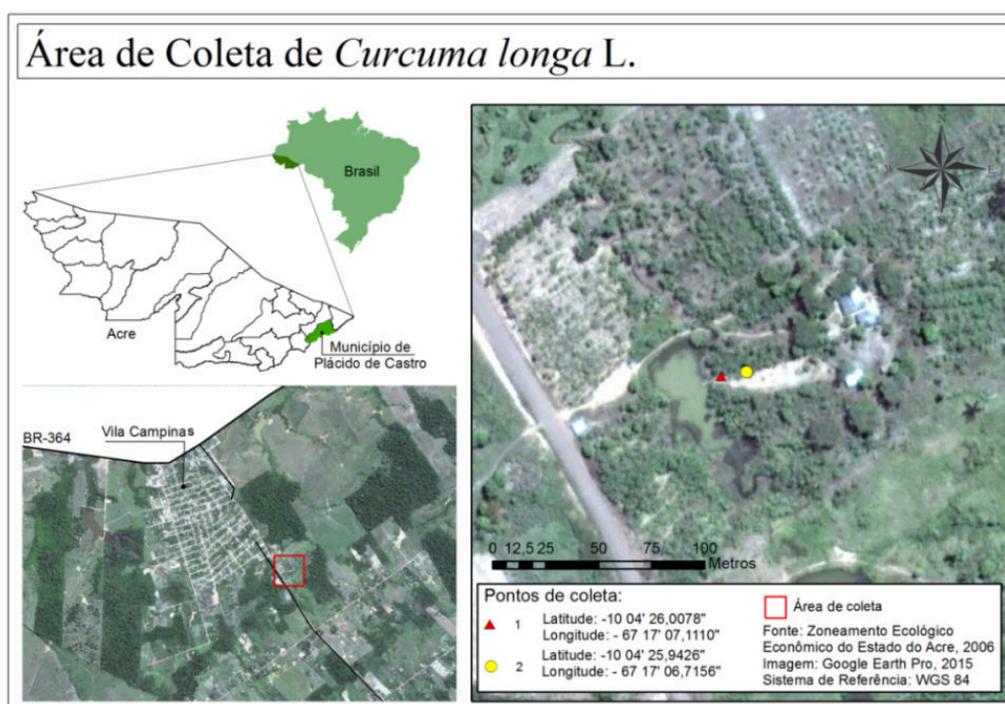
### 3.1.6 Destilador de água

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.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Coletas das folhas

As folhas e rizomas da espécie *Curcuma longa* L. foram coletadas de plantas jovens e adultas variando de 30 cm a 100 cm de altura em uma propriedade particular localizada na Vila Campinas, no Município de Plácido de Castro, no estado do Acre, o ponto um tem Latitude  $-10^{\circ} 04' 26,0078''$  e Longitude  $-67^{\circ} 17' 07,1110''$  e o ponto dois tem Latitude  $-10^{\circ} 04' 25,9496''$  e Longitude  $-67^{\circ} 17' 06,7156''$  (Figura 16). A coleta das folhas foi realizada em um mês chuvoso, sendo feita no dia 25 de fevereiro de 2015. Foi realizado um registro da espécie *Curcuma longa* L. (exsicata) no laboratório de Botânica da UFAC, com número do tombo 20.002.



**Figura 16:** Vista aérea da área de coleta de *Curcuma longa* L. na Vila Campinas, Município de Plácido de Castro, Estado do Acre, Brasil.

### **3.2.2 Seleção do material botânico**

As folhas com aparência saudável e os rizomas de *Curcuma longa* L. foram selecionados e lavados, retirando as partes danificadas e limpando a terra entranhada entre os rizomas, foram levados para aferir a sua massa e em seguida as folhas foram colocadas em uma das estufas à temperatura de 40 °C por 48 horas, os rizomas foram colocados em outra estufa com a temperatura de 60 °C por 48 horas, onde ocorreu a secagem uniforme. A massa de folhas frescas foi de 2.634,96 g, já a de rizomas frescos foi de 8.492,54 g.

### **3.2.3 Trituração das folhas e dos rizomas**

Depois que as folhas e os rizomas secaram foram levados à Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) da UFAC, para a trituração em moinho tipo faca. Em seguida aferiu-se a massa de folhas e rizomas. As folhas secas ficaram com massa de 521,18 g e os rizomas com 1.030,92 g. As amostras foram separadas em recipientes diferentes e levados para refrigerar, evitando que entrasse em contato com umidade do ar por muito tempo.

### **3.2.4 Extração do Óleo Essencial das folhas de *Curcuma longa* L.**

As folhas secas de *Curcuma longa* L. finamente trituradas foram hidrodestiladas durante 4 horas com o uso de aparelho tipo Clevenger modificado, instalado no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC. Utilizou-se para a extração 4 litros de água destilada e 370 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo redondo com capacidade para 5.000 mL. No final da extração foi feita a aferição do volume do OE no mesmo aparelho clevenger, que foi de 5,2 mL de óleo essencial, para em seguida ser armazenado em tubo de ensaio com tampa, depois foi passado folha de alumínio em volta do frasco e colocado em refrigerador à temperatura inferior a 5 °C para posterior análise.

### **3.2.5 Extração do Óleo Essencial dos rizomas de *Curcuma longa* L.**

Os rizomas secos de *Curcuma longa* L. finamente triturados foram hidrodestilados 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 litros de água destilada e 250 g de rizoma seco triturado colocado em balão de fundo redondo com capacidade para 5.000 mL. No final da extração foi feita

a aferição do volume do OE no mesmo aparelho Clevenger, no total foram 13 mL de óleo essencial, para em seguida ser armazenado em tubo de ensaio com tampa, foi passado folha de alumínio em volta do frasco e colocado em refrigerador à temperatura inferior a 5 °C para posterior análise.

### 3.2.6 Cálculo do rendimento (%) do Óleo Essencial de *Curcuma longa* L.

Segundo Santos et al. (2004), 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 não ser levado em conta a verdadeira quantidade de biomassa seca utilizada.

No cálculo do rendimento da extração de óleo essencial utilizando o método BLU, temos a seguinte equação (5):

$$TO = \frac{V_o}{B_m - \left(\frac{B_m \times U}{100}\right)} \times 100 \quad (5)$$

onde,

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

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

Bm = 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.

### 3.2.7 Desenvolvimento das nanoemulsões

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 OEFCL e o OERCL, e como tensoativos foram usados Polissorbato 80 e Oleato de Sorbitano 80 com especificações apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5:** 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

Fonte: Costa (2015)

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

#### 3.2.7.1 Determinação do Equilíbrio Hidrofílico e Lipofílico (EHL) requerido do óleo essencial de *Curcuma longa* L.

Para o estudo do Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL) do óleo, utilizou-se um tensoativo hidrofílico e outro lipofílico. A determinação do EHL requerido do OECL da folha e do rizoma foi realizada a partir de valores de EHL de 11,0 até 13,0 (Tabela 6). 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:

$$\frac{M_A \cdot EHL_A + M_B \cdot EHL_B}{M_A + M_B} = EHL_{Final} \quad (6)$$

$$M_A + M_B = 10 \text{ g} \quad (7)$$

Em que:

$M_A$  = massa de tensoativo hidrofílico;

$M_B$  = massa de tensoativo lipofílico;

EHL<sub>A</sub> = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL<sub>B</sub> = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

EHL<sub>Final</sub> = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Final.

As formulações dos tensoativos com diferentes valores de EHL foram preparadas com massa total de 10,0 g visando sua utilização para diversas amostras. 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 6.

**Tabela 6:** Massas dos tensoativos para formulações de diferentes EHL.

EHL Final	EHL Tween 80	Massa (g) Tween 80	EHL 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

Fonte: Costa (2015)

Analisando o trabalho de Costa (2015) as melhores nanoemulsões (com menores tamanhos e maior estabilidade) são obtidas quando se utiliza a fase oleosa numa concentração de 5% e para o tensoativo em concentrações que variam entre 10% e 15%. Para o presente trabalho foram produzidas nanoemulsões com EHL entre 11 e 13 e 10% de tensoativos, bem como 5% de fase oleosa. As quantidades totais dos componentes da emulsão - água, óleo e tensoativos, utilizadas nas formulações, estão descritas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Composição das formulações para estudo do EHL – 10% de tensoativos.

Formulação	EHL	Água (%)	Massa da água (g)	Tensoativo (%)	Massa do tensoativo (g)	Óleo (%)	Massa do Óleo (g)	Massa Total (g)
F-11	11,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0
F-12	12,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0
F-13	13,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0
R-11	11,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0
R-12	12,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0
R-13	13,0	85	4,25	10	0,5	5	0,25	5,0

O valor do EHL requerido do OEFCL e OERCL será determinado tomando-se como referência a emulsão que após 24 horas de formulada e submetida ao teste de centrifugação não apresentar os fenômenos de instabilidade como cremação, sedimentação e separação de fases (MORAIS et al., 2006) bem como apresentar tamanho menor que 100 nm . Assim o valor do EHL<sub>final</sub> da emulsão mais estável corresponde ao valor de EHL<sub>requerido</sub> do OEFCL e do OERCL.

### 3.2.7.2. Teste de centrifugação

Para avaliar a presença do efeito de cremação ou sedimentação nas formulações, as emulsões preparadas após 24 horas foram levadas a centrífuga e submetidas ao ciclo de rotação de 1000, 2500 e 3500 rpm (164, 1041 e 2034 G, respectivamente) durante 15 minutos para cada ciclo (LIMA et al. 2008).

### 3.2.7.3 Caracterização das nanoemulsões

As propriedades físico-químicas avaliadas das formulações preparadas foram o diâmetro médio das gotículas, potencial zeta e índice de polidispersividade. A caracterização do diâmetro, do potencial zeta e do índice de polidispersividade das formulações foram realizadas através do espalhamento de luz dinâmico e da mobilidade eletroforética, utilizando-se um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern) do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – Fiocruz Rondônia. Para leitura no equipamento foram diluídos 100 µL das formulações em 900 µL de água purificada. Os resultados foram expressos como a média de três determinações.

### **3.2.7.3.1 Zetasizer**

O teste foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – Fiocruz Rondônia, utilizou-se o Zetasizer Nano ZSP<sup>®</sup> da Malvern Instruments Ltd (Reino Unido, laser 633 nm), que possui as seguintes especificações em relação ao tamanho de partículas e tamanho molecular na faixa de medição: 0,3 nm a 10,0 µm (diâmetro); Princípio de medição: Espalhamento de luz dinâmico; Volume mínimo da amostra: 12 µL; Precisão: Melhor que ±2% em padrões NIST. E, também, as seguintes características gerais: Faixa de controle da temperatura: 0°C - 90°C ±0,1; Fonte de luz: He-Ne laser 633 nm, Máx 10 mW.

### **3.2.8 Espectroscopia Raman**

Para determinação das estruturas moleculares presentes nos compostos do OEFCL e do OERCL foram realizadas medidas de espectroscopia Raman no intervalo de 80 cm<sup>-1</sup> a 3600 cm<sup>-1</sup>.

A medida dos espectros no Raman foi realizada na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) por um espectrômetro micro-Raman, modelo LabRam HR 800, da marca Horiba Inc., com faixa de resposta entre 80 e 3600 cm<sup>-1</sup>, com laser He-Ne operando com comprimento de onda de 633 nm, microscópio com lente de ampliação de 10X, pinhole de 100 µm. O tempo de integração para a medida foi de 5s, a potência estimada de 10 mW e o número de acumulações de 5 vezes. Após passar pelas grades de refração o sinal Raman advindo da amostra foi coletado por meio de CCD tipo Peltier, operando à temperatura de -70°C.

### **3.2.9 Espectroscopia na faixa do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)**

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC (Campus Rio Branco). A medida da espectroscopia no infravermelho (IV) foi feita no equipamento de infravermelho Marca: Perkin Elmer Frontier Dual Range, Modelo: Frontier FT-IR/NIR, com varredura em comprimento de onda de 4000 a 450 cm<sup>-1</sup>. Para a obtenção dos espectros IV-TF dos OECL, uma gota de cada amostra (puro) foi introduzida na cavidade do equipamento onde encontra-se o prisma de cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe). O espectrômetro estava no modo de transmissão ATR e a medição foi

realizada operando na faixa do espectro de luz infravermelho médio, entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $100\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.2.10 Espectroscopia na faixa do Ultravioleta Visível (UV-Vis)**

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC (Campus Rio Branco). A medida da espectroscopia ultravioleta foi feita no equipamento de UV-Vis espectrofotômetro da Marca: Perkin Elmer, Modelo: Lambda 950. O aparelho foi calibrado na faixa espectral de 190 nm a 800 nm por meio da realização de uma leitura padrão inicial, sem amostra, e outra leitura apenas com o solvente. Após foram colocadas as cubetas uma com o solvente e a outra com o solvente e as amostras.

As amostras dos OECL foram preparadas usando o solvente Hexano nas concentrações 0,33%, 0,0132% e 0,00220% de óleo/solvente, tais concentrações foram necessárias para obter-se linearidade nas leituras do equipamento.

Foram realizadas tantas leituras quanto a quantidade de diluições. As varreduras no espectrômetro foram realizadas em intervalos de 10 nm referentes às faixas de comprimento de onda entre 190 nm e 800 nm.

### **3.2.11 Cromatografia Gasosa com Espectro de Massa**

A análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) foi realizada na Unesp (Universidade Estadual de São Paulo), em um cromatógrafo a gás Shimadzu Modelo 17A em interface com um detector seletivo de massa Shimadzu Modelo QP5050A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi feita em um capilar de sílica não polar, coluna HP-1MS (30 m X 0.25 mm i.d X 0.25  $\mu\text{m}$  de filme) com dimetilpolisiloxane como fase estacionária e utilizou-se hélio como gás transportador com fluxo constante de  $1\text{ mL min.}^{-1}$ . As amostras aliqüotadas ( $1\mu\text{L min.}^{-1}$ ) foram injetadas no modo separado (1:20) com solvente e tempo de corte (4 min.). O injetor e o detector foram mantidos a  $280^{\circ}\text{C}$  e  $300^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O forno estava à temperatura inicial de  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos e depois aumentou para  $290^{\circ}\text{C}$ , a  $2^{\circ}\text{C por min.}^{-1}$ . Finalmente a temperatura foi mantida constante por 10 minutos completando 133 minutos de análise total e a tensão de ionização de 70 eV.

### 3.2.12 Teste da citotoxicidade frente aos macrófagos

O teste foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – Fiocruz Rondônia para avaliar o efeito citotóxico in vitro do OECL dos Rizomas, das Folhas e das nanoemulsões em células vivas, utilizaram-se macrófagos de camundongos da linhagem J774. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. O ensaio de MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH formando cristais de formazan. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Os macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados a  $2,5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços e foram mantidos durante 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a aderência dos macrófagos. Após a aderência dos macrófagos foi adicionado 20µL de OECL (grupo tratado com OECL do rizoma e da folha) bem como 20µL das formulações das nanoemulsões (grupos tratados com nanoemulsões); em ambos os casos a concentração foi 2% por poço e os poços contendo apenas os macrófagos em meio de cultura foram utilizados como controle, sendo a placa levada para estufa de incubação nas mesmas condições anteriormente citada. Após incubação por 24 horas adicionou-se 10 µL de solução de MTT na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> em cada poço e levou-se novamente para incubação por 4 horas. Decorrido o tempo foi adicionado 150 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os cálculos foram determinados utilizando-se fórmula (8):

$$C\% = \left( 1 - \frac{DO_{Amostra}}{DO_{Controle}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde, C% é a citotoxicidade em porcentagem, DO<sub>amostra</sub> é a densidade ótica da amostra e DO<sub>controle</sub> é a densidade ótica do controle.

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas e expressos em porcentagem de citotoxicidade.

### 3.2.13 Teste da atividade antibacteriana

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UFAC (Campus Rio Branco). As amostras obtidas de OE da folha e do rizoma de *Curcuma longa* L., juntamente com as nanoemulsões, foram submetidas ao ensaio de atividade antimicrobiana utilizando a técnica de difusão em disco segundo o NCCLS (2003). Para tanto, as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram crescidas a 37°C por 4-6 h sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. As bactérias então foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Muller-Hinton, depositados sobre estes discos de papel e sobre estes 20 µL das amostras e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente ao processo de incubação, foram considerados com atividade antibacteriana, as amostras que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco. Os halos de inibição produzidos foram medidos com ajuda de paquímetro digital.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Rendimento dos OECL

#### 4.1.1 Rendimento do OEFCL

O rendimento médio do OEFCL extraído por hidrodestilação foi de 1,41% (Tabela 8). Esse valor representa que para 100 gramas de folhas secas de FCL foram obtidos 1,41 mL de OE por meio de hidrodestilação.

**Tabela 8:** Rendimento do OEFCL

Extração	Massa (g)	Volume (mL)	Rendimento (% ou mL/100g)
01	370	5,2	1,41

#### 4.1.2 Rendimento do OERCL

O rendimento médio do OERCL extraído por hidrodestilação foi de 2,6% (Tabela 9). Esse valor representa que para 100 gramas de folhas secas de RCL foram obtidos 2,6 mL de OE por meio de hidrodestilação.

**Tabela 9:** Rendimento do OERCL

Extração	Massa (g)	Volume (mL)	Rendimento (% ou mL/100g)
01	250	6,5	2,6
02	250	6,5	2,6

### 4.2 EHL requerido para o OECL e Caracterização das nanoemulsões

Após serem submetidas ao teste de centrifugação as formulações variando o seu EHL de 11 a 13 se apresentaram estáveis. Considerando a nanoemulsão mais estável como sendo aquela que apresenta o maior valor em módulo para o potencial zeta o EHL<sub>requerido</sub> para o OEFCL e para o OERCL foi o resultante da formulação preparada com tensoativos cujo valor de EHL era igual a 11,0. Os valores do potencial zeta, do tamanho e do índice de polidispersividade das formulações encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10:** Valores do potencial zeta, do tamanho e do índice de polidispersividade das formulações.

<b>Formulação</b>	<b>EHL do Tensoativo</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersividade</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
F-11	11	47,69	0,357	-9,55
F-12	12	41,88	0,415	-9,53
F-13	13	24,79	0,290	-3,60
R-11	11	42,78	0,401	-19,0
R-12	12	39,13	0,397	-11,80
R-13	13	41,67	0,375	-6,58

Todas as formulações resultaram em nanoemulsões, no entanto, o índice de polidispersividade (valores acima de 0,200 nm) e o potencial zeta das nanoemulsões indicam que existem populações diferentes dentro das nanoemulsões, ou seja, que as nanoemulsões não estão homogêneas, indicando que estas podem se desestabilizar com o passar do tempo, coalescendo. Pois, os grandes aglomerados são formados por partículas pequenas.

Em relação ao tamanho das nanopartículas, tão importante quanto o valor médio do diâmetro das partículas (DP) é o valor de sua dispersão. Neste trabalho, a homogeneidade no diâmetro de partículas pode ser avaliada pelo índice de polidispersibilidade (IP). A polidispersão, ou índice de polidispersividade, indica a distribuição média do tamanho das nanopartículas sendo valores menores que 0,200, considerados bons indicadores de homogeneidade (MOHANRAJ; CHEN, 2006 e DE MELO et al., 2010). Estes valores são desejados para manter a estabilidade da dispersão coloidal sem a formação de micropartículas ou precipitados (CAZO et al., 2012).

O melhor resultado de nanoemulsão para o potencial zeta (LIEBERMAN et al., 1988 e LIEBERMAN et al., 1989) foi a R 11, nanoemulsão produzida com o OERCL, que apresentou o valor igual a -19,0. Em relação ao índice de polidispersibilidade a melhor nanoemulsão foi a F 13, nanoemulsão produzida com o OEFCL.

### **4.3 Espectrometria Raman**

#### **4.3.1 Espectrometria Raman do OEFCL**

A relação entre os espectros obtidos e os modos vibracionais dos compostos foi atribuída com base no trabalho de Smith; Dent (2005). Os espectros obtidos estão representados na Figura 18, em  $400\text{ cm}^{-1}$  pode-se observar que a banda foi atribuída à deformação angular de ligações do tipo C-C, são ligações bastante comuns nos hidrocarbonetos.

Em 809  $\text{cm}^{-1}$  e 843  $\text{cm}^{-1}$  observam-se as bandas associadas ao estiramento simétrico C-O-C, esse tipo de ligação está presente em moléculas como o Dióxido de Limoneno e o Eucaliptol. Em 1152  $\text{cm}^{-1}$  e 1458  $\text{cm}^{-1}$  as bandas estão associadas a anéis aromáticos com deformação axial do tipo C-C presentes em anéis aromáticos evidencia a presença de compostos aromáticos como Ar-tumerona, o-cimeno, 8-Cimen-8-ol.

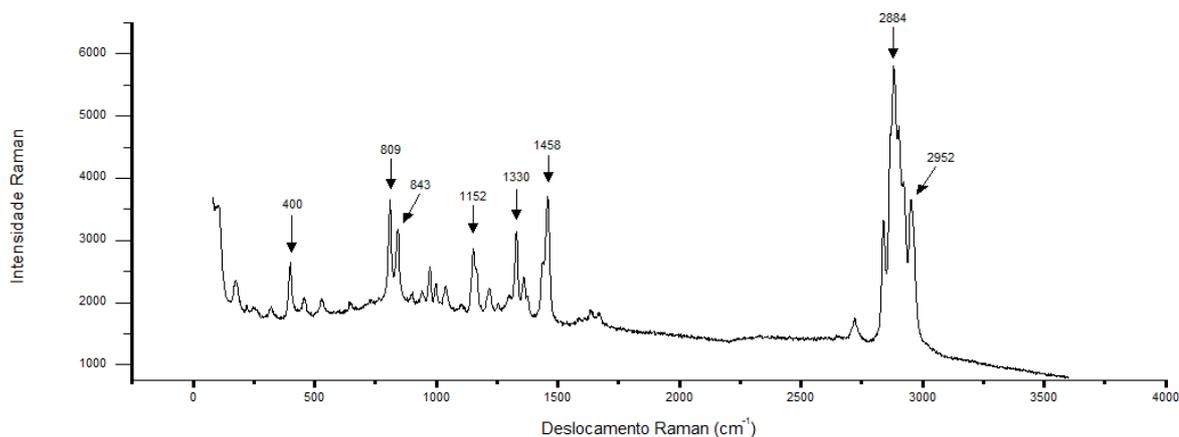
Smith; Dent (2005) dizem que abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  alguns grupos têm ligações específicas (O=C=O, O=N=O), muitas moléculas têm padrões complexos de vibrações. Esta região é conhecida como a região de impressão digital. Em 1330  $\text{cm}^{-1}$  é a região onde ocorrem bandas de carboxilato. O carboxilato ( $\text{HC-OO}^-$ ) é um sal ou éster de um ácido carboxílico como o Dietilftalato (também conhecido como Ácido 1,2-Benzenocarboxílico).

A banda associada à deformação axial assimétrica do grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) é observada em 2884  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto a banda associada à deformação axial assimétrica do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) foi observada em 2952  $\text{cm}^{-1}$ . Os grupos metila e metileno estão presentes em moléculas como  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -farneseno, L-linalol, Terpinoleno, Nerolidol; compostos encontrados no OEFCL por CG-EM.

Na tabela 11 são apresentadas a posição e a identificação das bandas observadas no espectro Raman do OEFCL.

**Tabela 11:** Posição e identificações das bandas observadas nos espectros Raman do OEFCL

Numero de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação dos modos de vibração
400	Deformação angular simétrica C-C - ( $\delta$ C-C)
809	Deformação axial (ou estiramento) C-O-C - ( $\nu$ C-O-C)
843	Deformação axial (ou estiramento) C-O-C - ( $\nu$ C-O-C)
1152	Deformação axial (ou estiramento) C-C - ( $\nu$ C-C) Anel aromático
1330	Deformação axial (ou estiramento) $\text{HC-OO}^-$ - ( $\nu$ $\text{HC-OO}^-$ )
1458	Deformação axial (ou estiramento) C-C - ( $\nu$ C-C) Anel aromático
2884	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H) Deformação axial (ou estiramento) simétrica $\text{CH}_3$ - ( $\nu$ $\text{CH}_3$ )
2952	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H) Deformação axial (ou estiramento) assimétrica $\text{CH}_2$ - ( $\nu$ $\text{CH}_2$ )



**Figura 17:** Espectro Raman do OEFCL completo

### 4.3.2 Espectrometria Raman do OERCL

Para a determinação das estruturas moleculares presentes nos compostos do OERCL foram realizadas medidas de espectrometria Raman. Os espectros obtidos serão apresentados na Figura 18, em  $173\text{ cm}^{-1}$  (SMITH; DENT, 2005) pode-se observar que a banda foi atribuída a vibrações entrelaçadas sem atribuições a qualquer tipo de grupo (Tabela 12). Em  $400\text{ cm}^{-1}$  observa-se que a banda foi atribuída à deformação angular de ligações do tipo C-C, são ligações típicas nos hidrocarbonetos.

Em  $808\text{ cm}^{-1}$  e  $840\text{ cm}^{-1}$  observam-se as bandas associadas ao estiramento simétrico C-O-C, esse tipo de ligação está presente em moléculas como o Eucaliptol. Em  $1152\text{ cm}^{-1}$  e  $1456\text{ cm}^{-1}$  as bandas estão associadas a anéis aromáticos com deformação axial do tipo C-C presentes em anéis aromáticos evidencia a presença de compostos aromáticos como Ar-tumerona, m-cimeno, Curcumeno.

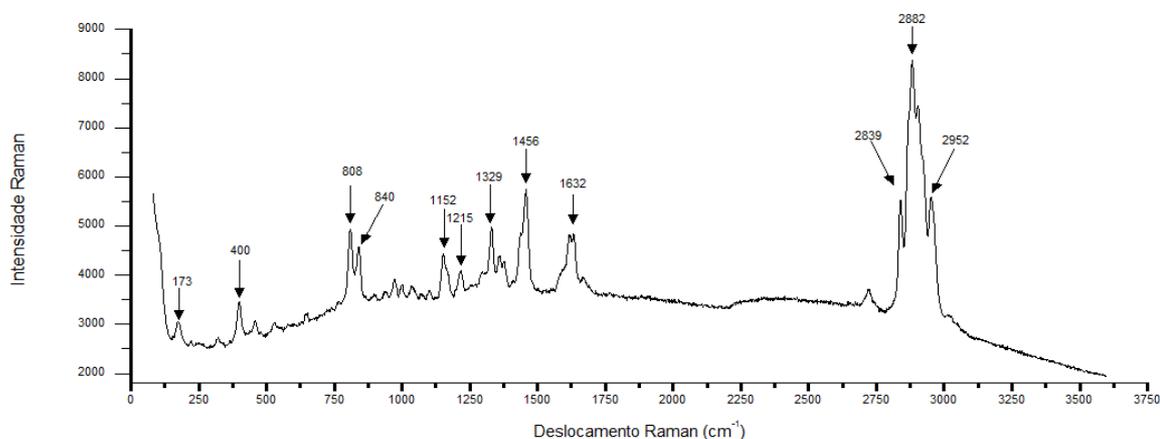
SMITH; DENT (2005) relatam que abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$  alguns grupos têm ligações específicas ( $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{O}=\text{N}=\text{O}$ ), muitas moléculas têm padrões complexos de vibrações. Esta região é conhecida como a região de impressão digital. Em  $1329\text{ cm}^{-1}$  é a região onde ocorrem bandas de carboxilato. O carboxilato ( $\text{HC}-\text{OO}^-$ ) é um sal ou éster de um ácido carboxílico como o Dietilftalato (Também conhecido como Ácido 1,2-Benzenocarboxílico).

O modo de estiramento simétrico C=C presente nas moléculas de terpenos e terpenóides foi observado em  $1632\text{ cm}^{-1}$ . A banda associada à deformação axial assimétrica do grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) são observadas em  $2839\text{ cm}^{-1}$  e em  $2882\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a banda

associada à deformação axial assimétrica do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) foi observada em  $2952\text{ cm}^{-1}$ . Os grupos metila e metileno estão presentes em moléculas como  $\alpha$ -tumerona,  $\beta$ -tumerona,  $\beta$ -sesquifelandreno, Terpinoleno, Curcumeno, Zingibereno; compostos encontrados no OERCL por CG-EM.

**Tabela 12:** Posição e identificações das bandas observadas nos espectros Raman do OERCL

Numero de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação dos modos de vibração
173	-
400	Deformação angular simétrica C-C - ( $\delta$ C-C)
808	Deformação axial (ou estiramento) C-O-C - ( $\nu$ C-O-C)
840	Deformação axial (ou estiramento) C-O-C - ( $\nu$ C-O-C)
1152	Deformação axial (ou estiramento) C-C - ( $\nu$ C-C)
	Anel aromático
1329	Deformação axial (ou estiramento) HC-OO <sup>-</sup> - ( $\nu$ HC-OO <sup>-</sup> )
1456	Deformação angular simétrica $\text{CH}_2$ - ( $\delta$ $\text{CH}_2$ )
	Anel aromático
1632	Deformação axial (ou estiramento) C=C - ( $\nu$ C=C)
2839	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H)
2882	Deformação axial (ou estiramento) simétrica $\text{CH}_3$ - ( $\nu$ $\text{CH}_3$ )
	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H)
2952	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H)
	Deformação axial (ou estiramento) assimétrica $\text{CH}_2$ - ( $\nu$ $\text{CH}_2$ )



**Figura 18:** Espectro Raman do OERCL completo.

#### 4.4 Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

##### 4.4.1 Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) do OEFCL

O OEFCL foi submetido à espectrometria IV-FT com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes e obteve-se um espectro com as principais faixas de maior absorção entre  $2959,59\text{ cm}^{-1}$  e  $728,25\text{ cm}^{-1}$  (Figura 19).

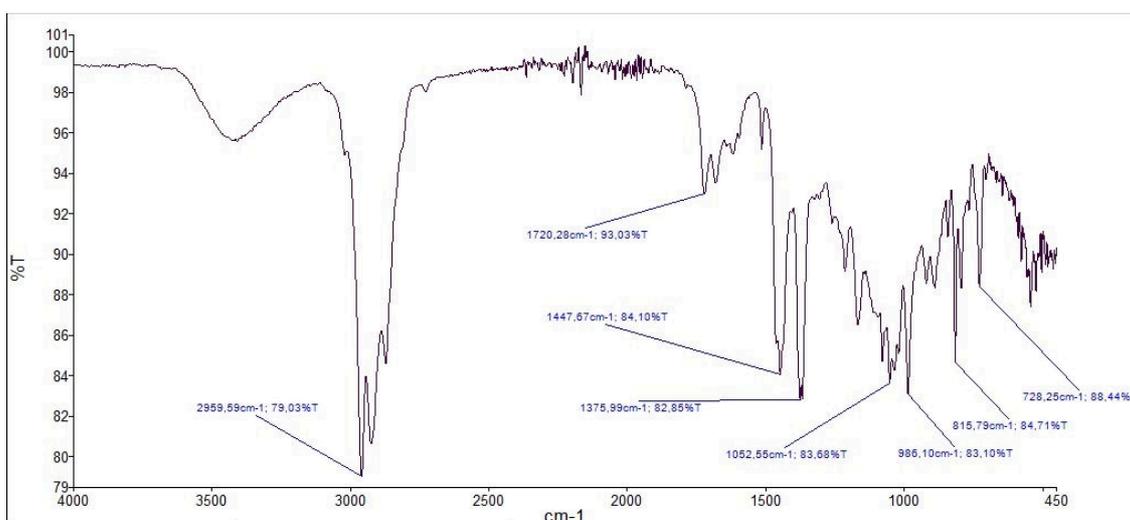


Figura 19: Espectro IV-TR do OEFCL

Os valores de números de ondas obtidos correspondem aos modos vibracionais da molécula e grupos funcionais demonstrados na Tabela 13. A tabela utilizada para identificar o modo vibracional e os grupos funcionais é um estudo realizado por Lopes; Fascio (2004), com o objetivo de facilitar a análise e interpretação de espectros de infravermelho.

Tabela 13: Posição e identificação das bandas observadas no IV-TF do OEFCL

Numero de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo vibracional	Grupo Funcional
2959,59	Deformação axial assimétrica C-H	Alcano
1720,28	Deformação axial C=O	Alquil/Cetona
1447,67	Deformação assimétrica C-H	Alcano
1375,99	Deformação simétrica C-H	Alcano
1052,55	Deformação angular C-H	Alceno
986,10	Deformação angular C-H	Alceno
815,79	Deformação C-H fora do plano	Benzeno

#### 4.4.2 Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) do OERCL

O OEFCL foi submetido à espectrometria IV-FT com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes e obteve-se um espectro com as principais faixas de maior absorção entre  $2927,92\text{ cm}^{-1}$  e  $542,02\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20).

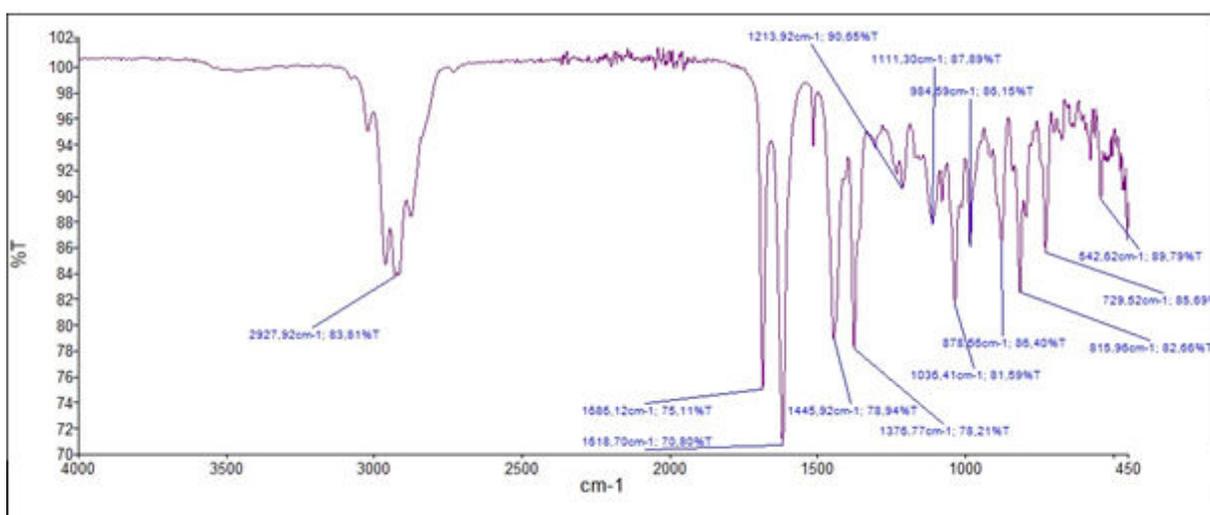


Figura 20: Espectro IV-TR do OERCL

Lopes; Fascio (2004) relatam em seu trabalho quais são grupos funcionais pelos valores de números de ondas obtidos, correspondendo aos modos vibracionais da molécula, estes estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 14: Posição e identificação das bandas observadas no IV-TF do OERCL

Numero de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo vibracional	Grupo Funcional
2927,92	Deformação axial assimétrica C-H	Alcano
1686,12	Deformação axial C=O	Aril/Cetona
1618,70	Estiramento C=C	Alceno
1445,92	Deformação assimétrica	Alcano
1376,77	Deformação angular C-H	Alcano
1213,92	Estiramento C-N	Aril/Alquil/Amina
1111,30	Estiramento C-O	Aril/Alquil/Éter
1036,41	Estiramento C-O	Aril/Alquil/Éter

984,59	Deformação C-H fora do plano	Olefina
878,56	Deformação C-H fora do plano	Olefina
815,96	Deformação C-H fora do plano	Benzeno
729,52	Deformação C-H fora do plano	Benzeno
542,62	Estiramento C-X	Haleto de Alquila

## 4.5 Espectrometria por Ultravioleta Visível (UV-Vis)

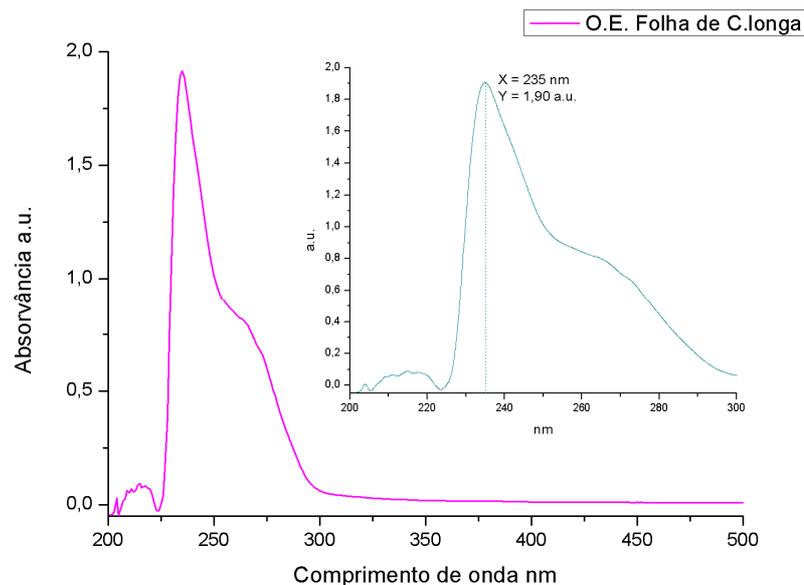
### 4.5.1 Espectrometria por Ultravioleta Visível (UV-Vis) do OEFCL

Ao submeter a amostra do OEFCL ao UV-Vis foi obtido um espectro com uma faixa de absorção de 235 nm de comprimento de onda, está na região do Ultravioleta próximo, que absorve compostos poli-insaturados e aromáticos (KOPLÍK, 2000) (Figura 21a), Reusch (2013) ao analisar o possível grupo funcional, em relação ao comprimento de onda de 235 nm constatou a indicação de um composto cromófora da família dieno bicíclico (ligação dupla), de estrutura fina vibracional, com aparência semelhante a do isopreno (Figura 21b).

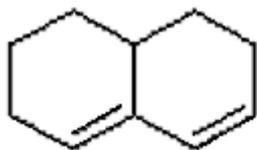
Schirmer (1990), no entanto, aponta que o pico 235 nm refere-se a um grupo funcional dieno com uma Imina (NOH). As iminas são o produto da condensação do amoníaco ou uma amina primária com uma cetona ou um aldeído (Figura 21c).

Koplík (2000), afirma que compostos com 5 carbonos heterocíclicos como o Tiofeno (que contém um átomo de enxofre em sua composição, Figura 20d) também apresentam 235 nm de comprimento máximo assim como o colesterol (Figura 21e).

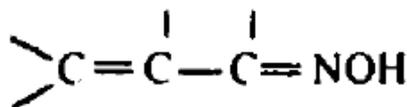
A estrutura que mais se encaixa dentro dos padrões apresentados acima é o  $\alpha$ -Felandreno cuja estrutura química é apresentada na Figura 23. O  $\alpha$ -felandreno é um monoterpeneo que tem a fórmula  $C_{10}H_{16}$  muito abundante em OE de outras espécies. Com transição  $\pi \rightarrow \sigma^*$  (KOPLÍK, 2000).



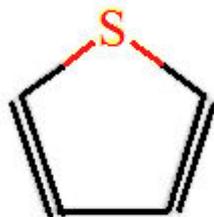
a)



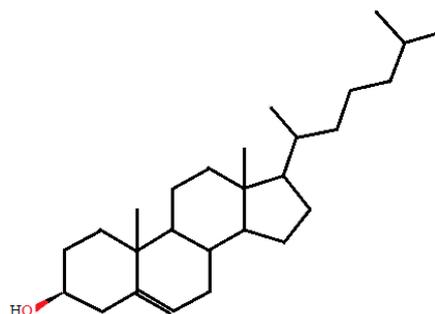
b)



c)



d)



e)

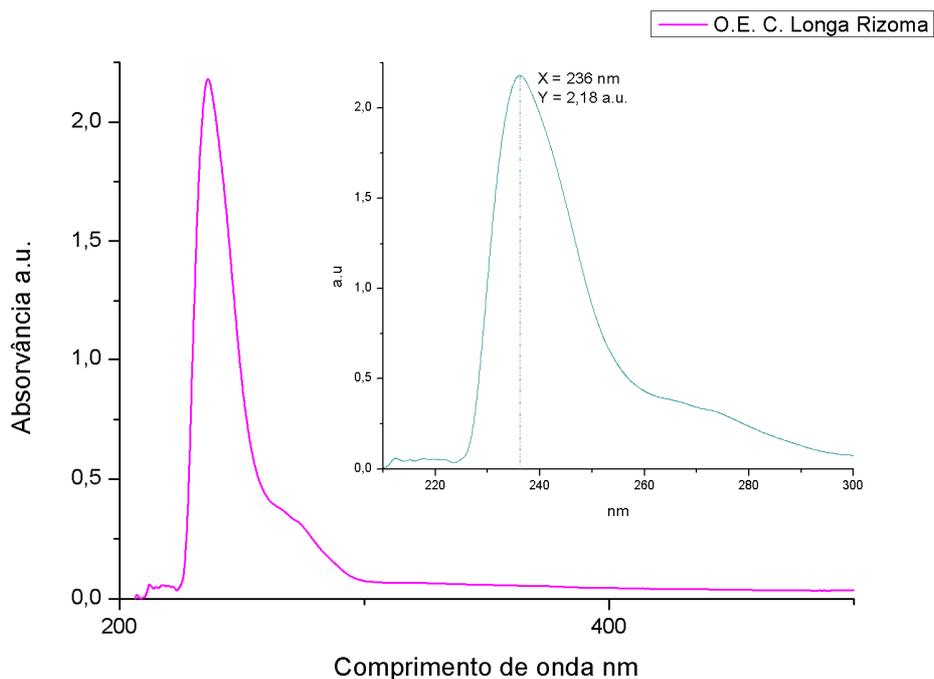
**Figura 21:** a) Espectro UV-Vis do OEFCL b) estrutura química do isopreno (Adaptado de REUSCH, 2013), c) Grupo funcional dieno conjugado com imina (Adaptado de SCHIRMER, 1990), d) Estrutura química do Tiofeno; (Adaptado do NIST) e) Estrutura química do colesterol (Adaptado do NIST).

#### 4.5.2 Espectrometria por Ultravioleta Visível (UV-Vis) do OERCL

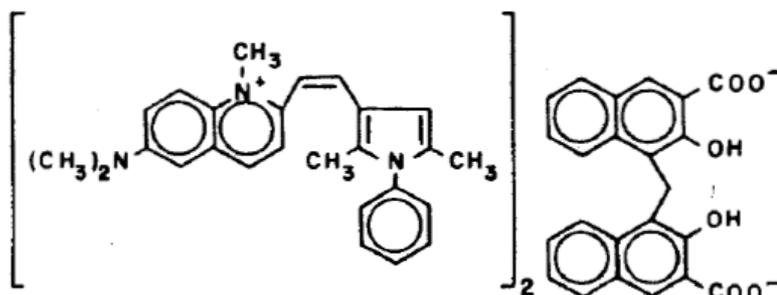
Ao submeter a amostra do OERCL ao UV-Vis foi obtido um espectro com uma faixa de absorção de 236 nm de comprimento de onda (Figura 22a), está na região do Ultravioleta próximo, que absorve compostos poli-insaturados e aromáticos (KOPLÍK, 2000). Schirmer (1990) afirma que as características de absorção típica UV-Vis dos grupos funcionais isolados com o comprimento de onda entre 235 e 240 nm são  $R_2S$ , com transição  $\pi \rightarrow \sigma^*$ . O corante

Evan's blue apresenta  $\lambda_{\text{max}}$  (Comprimento máximo de ondas) de 236 nm, 356 nm e 503 nm (Figura 22b). No trabalho de Costa et al. (2015) foram encontrados  $\lambda_{\text{max}}$  20,5 nm e 236,5 para a Quinolina-N-óxido (QNO) apresentada na Figura 22c, com transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

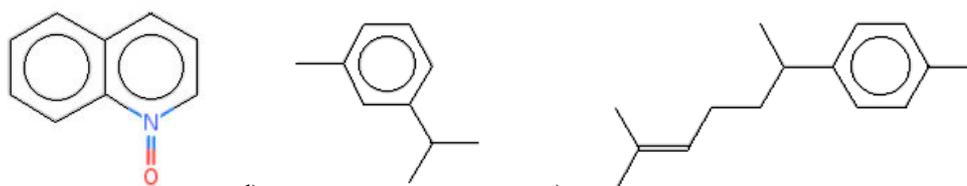
O composto m-Cimeno (Figura 22d) é um monoterpreno ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}$ ) e o Curcumeno (Figura 22e) que é sesquiterpreno ( $\text{C}_{15}\text{H}_{22}$ ) apresentam um anel aromático em suas cadeias, sugerindo que o pico apresentando pode ser um dos dois compostos apresentados na CG-EM.



a)



b)



c)

d)

e)

**Figura 22:** a) Espectro UV-Vis do OERCL b) Estrutura química do corante Evan's blue c) Estrutura química da QNA (adaptado do NIST) d) Estrutura química do m-Cimeno (adaptado do NIST) e) Estrutura química do Curcumeno (adaptado do NIST)

## 4.6 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

### 4.6.1 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa para o Óleo Essencial da Folha de *Curcuma longa* L. (OEFCL)

A partir da análise realizada para o óleo essencial das folhas de *C. longa* L. (OEFCL) foram identificados 24 compostos, representando 100% do OEFCL. Os componentes majoritários foram:  $\alpha$ -felandreno (27,37%), Terpinoleno (21,66%), Eucaliptol (12,72%) e o-Cimeno (7,0 %),  $\beta$ -pireno (4,40%),  $\beta$ -Farneseno (3,17%), 8-Cimen-8-ol (3,0%), Ar-tumerona (2,48%), Mirceno (2,37%),  $\alpha$ -pireno (1,71%),  $\alpha$ -tumerona (1,64%),  $\beta$ -tumerona (1,42%),  $\alpha$ -farneseno (1,41%), L-linalol (1,38%),  $\gamma$ -terpireno (1,34%), Dióxido de limoneno (1,09%), 3-Isopropil-4-metil-1-pentil-3-ol (1,07%), 4-Formiciclohexano (1,02%).

Diversos compostos encontrados no OEFCL relatado no presente trabalho (Tabela 15) também é relatado no trabalho Srivastava et al. (2005) e de Bahl et al. (2014) sobre o OEFCL, principalmente, os terpenóides:  $\gamma$ -terpineno, o-cimeno, Ar-tumerona,  $\alpha$ -tumerona e  $\beta$ -tumerona. Srivastava et al. (2005) encontraram compostos semelhantes aos encontrados neste trabalho e mais de 20 outros compostos.

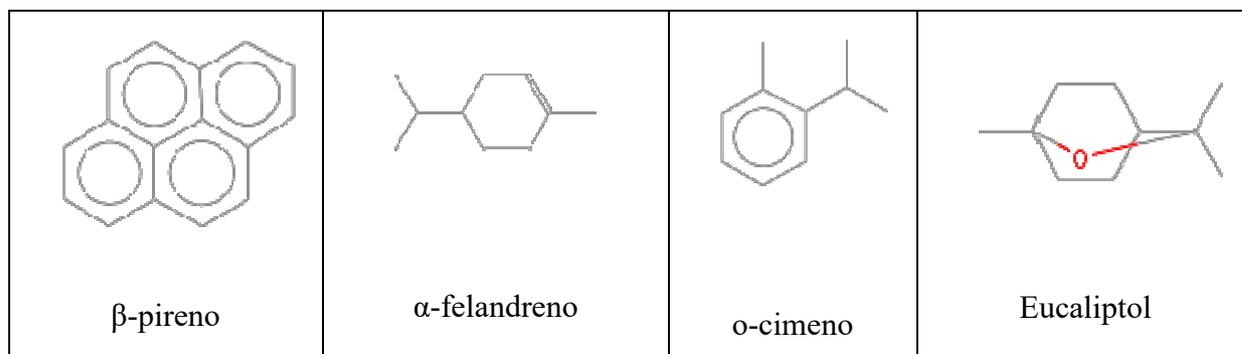
Os terpenóides  $\alpha$ -Pineno, 1,8-Cineoleno e Ar-curcumeno não estão citados para a composição do OEFCL neste trabalho (o Ar-curcumeno também não apareceu na CG-EM no trabalho de SRIVASTAVA et al., 2005). Foram encontrados o Delta-4-Careno, 4-formiciclohexano, 1,3,7-Octatrieno-3,7-dimetil e 3-Isopropil-4-metil-1-pentil-3-ol, não relatados em outros trabalhos. Sugerindo que a diferença de composição do OEFCL pode ser devido à localidade da coleta e também ao período da coleta, era período chuvoso, época em que as folhas estão bastante viçosas e em grande abundância (CASTRO et al., 2005).

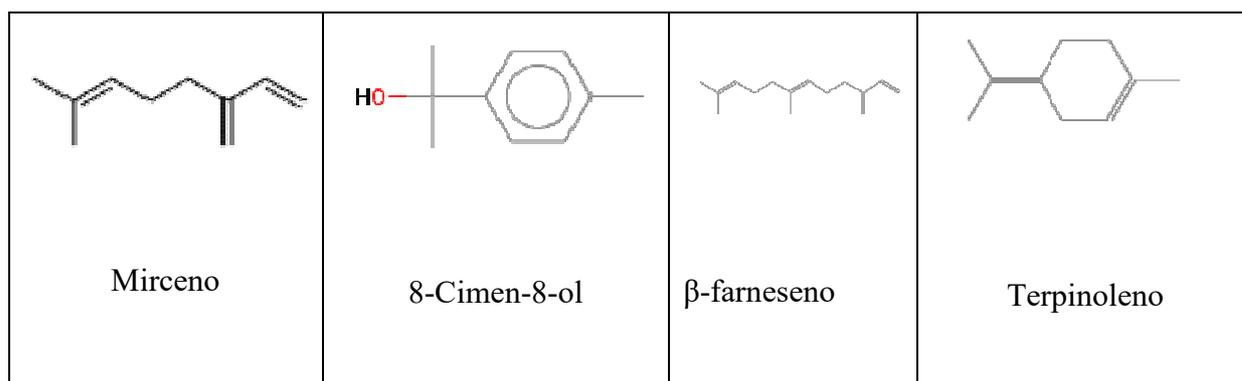
Na tabela 15 encontram-se nomes dos compostos presentes no OEFCL, os picos, o tempo de retenção e a fórmula. Percebe-se que este óleo é composto em sua maioria por monoterpenos com 8 compostos desta classe ( $C_{10}H_{16}$ ), representando 33,3%, 5 monoterpenóides ( $C_{10}H_{18}O$ ) (20,83%), 2 compostos sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), o que representa 8,33% do óleo. O OEFCL apresenta ainda em sua constituição 5 compostos sesquiterpnóides ( $C_{15}H_{22}O$ ) (20,83%), 1 composto diterpenóide ( $C_{20}H_{32}$ ) e outros 3 outros compostos (12,5%).

**Tabela 15:** Compostos do OEFCL identificando cada pico da figura 15, o tempo de retenção (TR), a área do pico, porcentagem da área do pico e o composto

Pico	TR	% Área	Similaridade (%)	Composto	Fórmula
1	20,22	1,71	97	$\alpha$ -pireno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
2	23,27	4,40	98	$\beta$ -pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>
3	24,22	2,37	96	Mirceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	25,34	27,37	97	$\alpha$ -felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	25,96	0,91	96	3-Careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	26,30	0,85	94	Delta-4-careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	26,51	7,00	97	o-cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
8	27,19	12,72	95	Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,58	0,19	92	1,3,7-Octatrieno-3,7-dimetil	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	29,48	1,34	95	$\gamma$ -terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
11	31,88	21,66	97	Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
12	32,27	1,38	97	L-linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	35,69	1,02	82	4-Formiciclohexano	-
14	38,17	3,00	95	8-Cimen-8-ol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
15	39,14	0,78	95	Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	42,27	1,09	85	Dióxido Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
17	47,85	1,07	84	3-Isopropil-4-metil-1-pentil-3-ol	-
18	58,74	3,17	92	$\beta$ -farneseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
19	59,35	0,79	92	Dietilftalato	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
20	61,96	1,41	94	$\alpha$ -farneseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
21	65,28	0,23	81	Nerolidol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
22	70,58	1,42	90	$\beta$ -tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
23	71,18	2,48	87	Ar-tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O
24	73,05	1,64	81	$\alpha$ -tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
TOTAL		100,00			

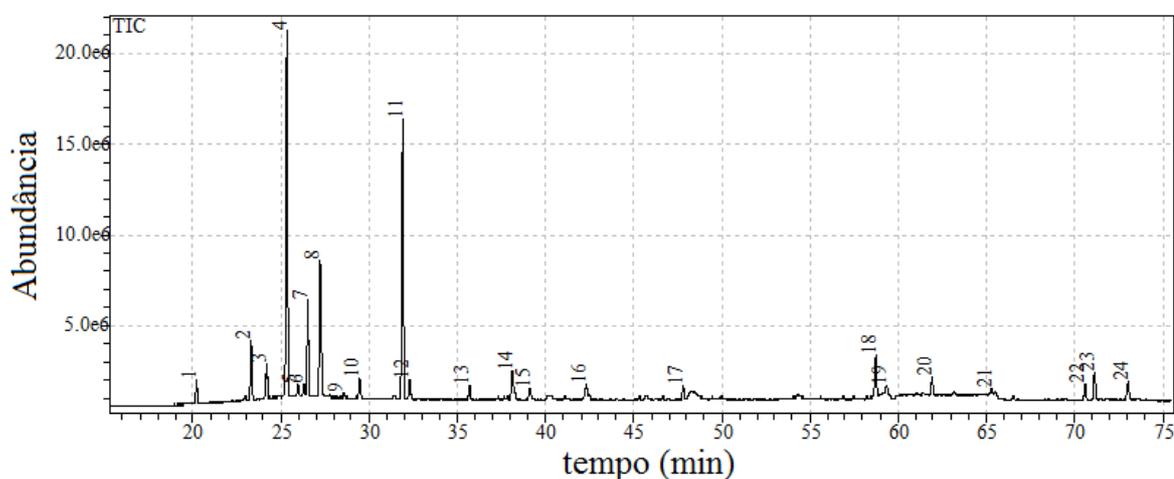
A figura 23 apresenta a estrutura molecular de 8 componentes que possuem a maior concentração no OEFCL. O cromatograma do OEFCL é apresentado na figura 24, onde estão contidas a abundância relativa e o tempo de retenção para cada pico.





**Figura 23:** Estrutura molecular dos principais constituintes do OEFCL

Fonte: NIST



**Figura 24:** Cromatograma do OEFCL mostrando os picos dos compostos em função do tempo, são 24 picos.

#### 4.6.2 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa para o Óleo Essencial do Rizoma de *Curcuma longa* L. (OERCL)

A análise do óleo essencial dos rizomas de *C. longa* L. (OERCL) identificou 11 compostos, representando 100% do OERCL. Os componentes são: Ar-tumerona (34,20%),  $\beta$ -tumerona (20,44%),  $\alpha$ -tumerona (15,95%), Eucaliptol (9,65%),  $\alpha$ -felandreno (8,02%), Terpinoleno (2,42%), m-cimeno (2,47%),  $\beta$ -sesquifelandreno (2,16%), Zingibereno (1,87%), Dietilftalato (1,71%) e Curcumeno (1,31%) (Tabela 16).

Os compostos encontrados no OERCL relatados neste trabalho também são encontrados nos trabalhos de Srivastava et al.(2005), Jayaprakasha et al. (2000), Bahl et al. (2014), Chassagnez-Méndez et al. (2000) e Majolo et al. (2014) com este óleo, sendo mais de 70 compostos já descritos na literatura ( como (Z)- $\gamma$ -atlantona, (E)- $\gamma$ -atlantona,  $\alpha$ -zingibereno,

$\beta$ -bisaboleno, Tumerol aromático,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno dentre outros). Isto sugere mais uma vez a diferença da composição do OERCL devido à localidade da coleta e da época do ano em que foi coletado, pois, o período de coleta era chuvoso (CASTRO et al., 2005).

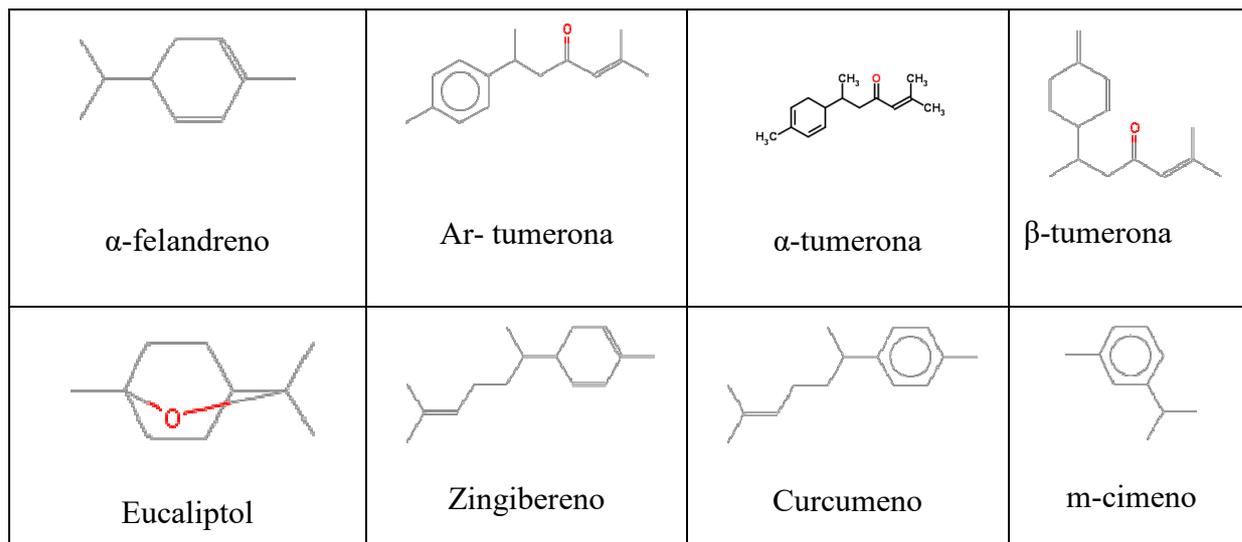
Na tabela 16 encontram-se os compostos presentes no OERCL identificados por correspondência de seus espectros de massa, onde o espectro obtido foi comparado em biblioteca fornecida pelo equipamento. Na tabela constam os nomes dos compostos, os tempos de retenção, a fórmula molecular, os autores que citam esses compostos constituintes em seus estudos, assim como a porcentagem de cada composto presente no OERCL.

Conforme a tabela 16 percebe-se que o OERCL têm seus compostos monoterpenos (3), sesquiterpenos (3) e sesquiterpenóides (3) equilibrados representando 27,27% cada, 1 monoterpenóide (9,09) e 1 outro composto (9,09%).

**Tabela 16:** Compostos do OERCL identificando cada pico da figura 17, o tempo de retenção (TR), a porcentagem da área do pico, o composto e a fórmula.

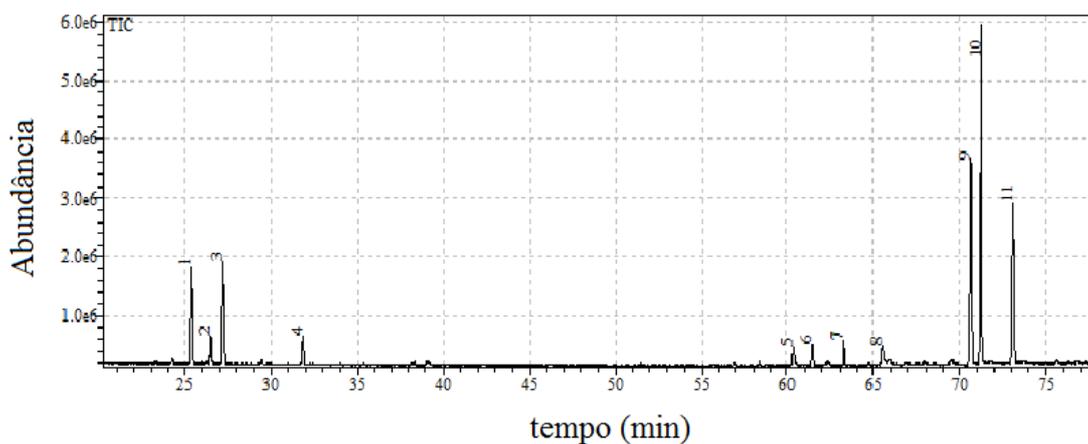
Pico	TR	% Área	Similaridade (%)	Composto	Fórmula
1	25,32	8,02	97	$\alpha$ -felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	26,50	2,27	95	m-cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
3	27,19	9,65	97	Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
4	31,86	2,42	95	Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	60,34	1,31	93	Curcumeno	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>
6	61,40	1,87	90	Zingibereno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
7	63,25	2,16	91	$\beta$ -sesquifelandreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
8	65,13	1,71	95	Dietilftalato	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
9	70,62	20,44	90	$\beta$ -tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
10	71,24	34,20	89	Ar-tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O
11	73,10	15,95	88	$\alpha$ -tumerona	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
TOTAL		100,00			

A figura 25 apresenta a estrutura de 8 componentes que possuem a maior concentração no OERCL. O cromatograma do OERCL é apresentado na Figura 26, onde estão contidos a abundância relativa e o tempo de retenção para cada pico.



**Figura 25:** Estrutura molecular dos principais constituintes do OERCL

Fonte: NIST



**Figura 26:** Cromatograma mostrando 11 picos de compostos encontrados no OERCL

#### 4.6.3 Comparação entre o OEFCL e o OERCL

Comparando o OEFCL e o OERCL percebe-se a maior diversidade de componentes no OEFCL e que apenas 7 compostos estão presentes nos dois óleos essenciais, além disso a porcentagem dos compostos semelhantes variou bastante (tabela 17). Os compostos presentes nos dois óleos são:  $\alpha$ -felandreno, Eucaliptol, Terpinoleno, Dietilftalato,  $\beta$ -tumerona, Ar-tumerona e  $\alpha$ -tumerona.

**Tabela 17:** Comparação entre os compostos identificados no Óleo Essencial da folha da *C. longa* L e o Óleo essencial do Rizoma de *C. longa* L.

Compostos	OEFCL	OERCL
$\alpha$ -felandreno	27,37%	8,02%
Eucaliptol	12,72%	9,65%
Terpinoleno	21,66%	2,42%
Dietilftalato	0,79%	1,71%
$\beta$ -tumerona	1,42%	20,44%
Ar-tumerona	2,48%	34,20%
$\alpha$ -tumerona	1,64%	15,95%

Embora os óleos essenciais tenham sido extraídos das mesmas plantas o fato de o OEFCL ser diferente do OERCL já era esperado, pois, cada região da planta pode armazenar substâncias diferentes em concentrações que diferem entre si. Deve-se levar em conta que por se tratar de um produto natural as concentrações dos compostos podem aumentar ou diminuir de acordo com a época das chuvas. Como as folhas da *C. longa* costumam murchar e cair no período que vai de maio a outubro, no estado do Acre, não é possível fazer a coleta neste período, os rizomas, no entanto, podem ser coletados a qualquer época do ano.

Na tabela 18 estarão contidos mais de 70 compostos encontrados no OERCL em alguns trabalhos publicados e 49 compostos no OEFCL.

**Tabela 18:** Compostos encontrados nos OERCL e OEFCL que constam na literatura

OERCL		OEFCL	
Composto	Referência	Composto	Referência
1 $\alpha$ -pineno	1, 3, 4, 5	$\alpha$ -pineno	3, 4
2 $\beta$ -pineno	3, 4	$\gamma$ -terpineno	3, 4
3 Mirceno	1, 3, 5	1,8-cineoleno	3, 4
4 $\alpha$ -felandreno	1, 2, 4, 5	o-cimeno	3
5 $\alpha$ -terpineno	1, 4	Ar-curcumeno	3
6 <i>p</i> -cimeno	1, 2, 3, 4, 5	Ar-tumerona	3, 4
7 Limoneno	1, 4	$\alpha$ -tumerona	3, 4
8 1,8-Cineoleno	1, 3, 4	$\beta$ -tumerona	3
9 $\gamma$ -terpineno	1, 3, 4, 5	$\alpha$ -tujeno	4
10 Terpinoleno	1, 4, 5	Canfeno	4

11	<i>p</i> -cimoneno	1	Sabineno	4
12	4-terpinol	1	$\beta$ -pineno	4
13	8- <i>p</i> -Cimenol	1	Mirceno	4
14	$\alpha$ -terpineol	1, 2, 5	2-Octanol	4
15	Timol	1	Acetato de ( <i>Z</i> )-3-Hexenil	4
16	Carvacrol	1	$\alpha$ -felandreno	4
17	$\alpha$ - <i>cis</i> -Bergatomeno	1,2	$\delta$ -3-careno	4
18	Cariofileno	1	$\alpha$ -terpineno	4
19	$\alpha$ -Humuleno	1	<i>p</i> -cimeno	4
20	$\gamma$ -Curcumeno	1	Limoneno	4
21	Ar-curcumeno	1, 3, 4, 5	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimeno	4
22	$\alpha$ -zingibereno	1, 2, 3, 4, 5	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	4
23	$\beta$ -Bisaboleno	1, 2	Terpinoleno	4
24	$\beta$ -Sesquifelandreno	1, 4, 5	Linalol	4
25	$\beta$ -germaceno	1	<i>trans</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	4
26	Ar-tumerol	1, 4, 5	Canfora	4
27	Ar-tumerona	1, 3, 4, 5	<i>p</i> -cimen-8-ol	4
28	( <i>Z</i> )- $\gamma$ -atlantona	1	<i>cis</i> -sabinol	4
29	( <i>E</i> )- $\gamma$ -atlantona	1	2-decanol	4
30	(6 <i>S</i> , 7 <i>R</i> )-bisaboleno	1, 5	$\alpha$ -terpineol	4
31	( <i>E</i> )- $\alpha$ -atlantona	1, 4	<i>cis</i> -carvotanacetol	4
32	<i>Trans</i> - <i>o</i> -cimeno	2	<i>cis</i> -carveol	4
33	Cariofileno	2, 4	Neral	4
34	Curcumeno aromático	2	Geranial	4
35	$\beta$ -( <i>Z</i> )-farneseno	2, 4	Undecanol	4
36	$\gamma$ - <i>cis</i> -bisaboleno	2	$\beta$ -elemeno	4
37	Óxido de Cariofileno	2	$\beta$ -cariofileno	4
38	Turmerol Aromático	2	$\gamma$ -elemeno	4
39	Tumerona	2, 5	$\beta$ -farneseno	4
40	$\alpha$ -tumerona	3, 4	Zingibereno	4
41	Tumerona aromática	2	$\alpha$ -selineno	4
42	Dihidrocurcumeno	2	$\beta$ -Sesquifelandreno	4
43	Curlone ( $\beta$ -tumerona)	2, 3, 4, 5	Ar-tumerol	4

44	Ácido Hexadecanóico	2	Viridiflorol	4
45	Ácido Heptadecanóico	2	Epóxido II de Humuleno	4
46	Linalol	3, 4	<i>t</i> -cardinol	4
47	2-octanol	4	Germacrona	4
48	$\delta$ -3-careno	4, 5	(E)- $\alpha$ -atlantona	4
49	Canfora	4	Heptilsalicilato	4
50	Mirtenal	4		
51	<i>cis</i> -sabinol	4		
52	Neral	4		
53	Tetradecano	4		
54	Acetato de Sabinil	4		
55	$\gamma$ -elemeno	4		
56	$\alpha$ -selineno	4		
57	$\beta$ -curcumeno	4		
58	(E)-nerolidol	4		
59	epi-curzerenona	4		
60	Viridiflorol	4		
61	Hidrato de <i>trans</i> -sesquisabineno	4		
62	Epóxido II de Humuleno	4		
63	10-epi- $\gamma$ -Eudesmol	4		
64	<i>t</i> -cardinol	4		
65	Germacrona	4		
66	Terpinen-4-ol	5		
67	Hexanoato de Geranil	4		
68	Cinamil Cinamato	4		
69	Furanodienona	4		
70	Heptilsalicilato	4		
71	Limoneno + silvestreno	5		
72	$\beta$ -atlantol	5		
73	1,8-cineol	5		

**Referências:** 1 (CHASSGNEZ-MÉNDEZ et al., 2000); 2 (JAYAPRAKASHA et al., 2000); 3 (BAHL et al., 2014); 4 (SRIVASTAVA et al., 2005); 5 (MAJOLO et al., 2014).

#### 4.7 Teste de citotoxicidade frente aos macrófagos

O ensaio de citotoxicidade (Figura 27) pelo método MTT revelou que a presença do OEFCL na concentração de  $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  reduziu a viabilidade dos macrófagos em cultura em 96,86%, o OERCL reduziu a viabilidade celular em 86,38% comparado ao controle, enquanto as formulações de nanoemulsões (NE) do OEFCL e OERCL, R11, R12, R13, F11, F12 e F13 apresentaram valores menores: entre 83,91% e 88,41% (Figura 28).

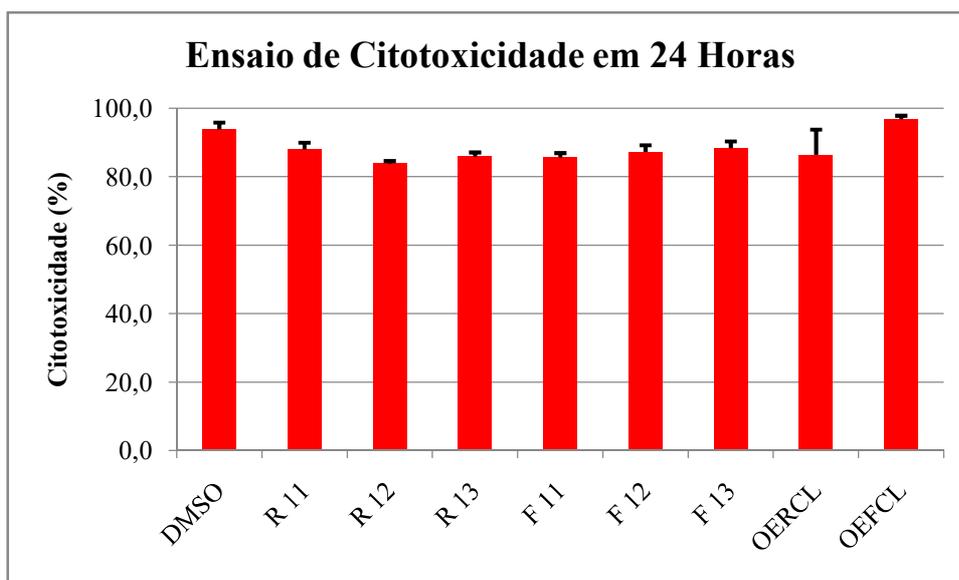


Figura 27: Gráfico do ensaio de citotoxicidade frente aos macrófagos.

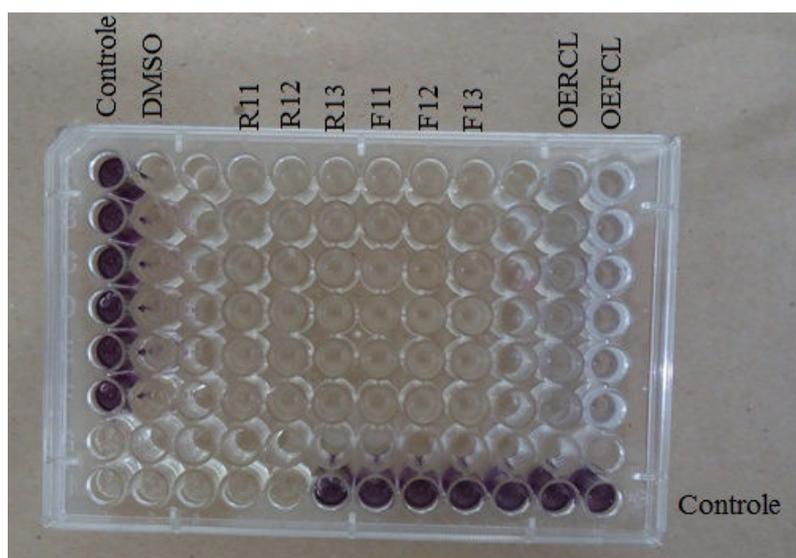


Figura 28: Placa de 96 poços com os macrófagos da linhagem J774, o controle não recebeu nenhum tratamento, foram feitas seis repetições de cada NE e de cada OE, R11: é a NE cujo EHL é 11 e o óleo usado para a sua produção foi o OERCL seguido respectivamente por R12 e R13. F11 representa a NE de EHL 11 produzida com OEFCL e assim sucessivamente. OERCL (óleo essencial do rizoma de *C. longa* L.). OEFCL (óleo essencial da

folha da *C. longa* L.). Apenas as células de controle ficaram coloridas, representando o quanto formaram cristais de formazan, portanto, apenas as células de controle continuaram viáveis.

Costa (2015) fez teste do óleo essencial de *Lantana camara* L. e de várias nanoemulsões formuladas em diferentes porcentagens com o OE de *Lantana camara* L., utilizando a concentração de 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do OE e das NE, o resultado encontrado foi que a presença do OE de *Lantana camara* reduziu a viabilidade dos macrófagos em cultura em 49,0% comparados ao controle, as nanoemulsões por sua vez apresentaram valores menores entre 22%, 7,2% e 3% concluindo que a NE foram menos tóxicas aos macrófagos. Resultado diferente do encontrado no presente trabalho.

Caldeira (2011) fez teste em macrófagos da linhagem J774 infectados com promastigota de *Leishmania amazonensis* (dez promastigotas para cada macrófago) com NE contendo anfotericina B (AmB) a citotoxicidade das NE foi muito menor do que aquela observada para o Anfotericin B<sup>®</sup> (AmB-D). Os dados mostraram também que o aumento da concentração da STE (amina lipofílica) aumenta a citotoxicidade das NE. Em consonância com esses achados e com dados previamente publicados, os estudos de eficácia in vitro em macrófagos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostraram que o aumento da concentração da STE na NE carregada com AmB aumenta a atividade leishmanicida.

Bruxel e colaboradores (2012) afirmam que a toxicidade das nanoemulsões depende da utilização de excipientes biodegradáveis e biocompatíveis. Como neste trabalho com *Curcuma longa* L. foram utilizados os tensoativos Span<sup>®</sup> 80 e Tween<sup>®</sup> 80 pode ser que estes tenham influenciado na toxicidade das nanemulsões, pois, apresentam somente 5% de OECL.

Foi realizado teste de análise de variância (obtido através do programa Assistat versão 7.7 Beta) a fim de verificar diferenças nas médias entre os grupos tratados por OEFCL, OERCL e as nanoemulsões, o resultado é mostrado na Tabela 19. Como o valor F (2,9364) encontrado é maior que F crítico (12,7399) podemos concluir que as médias não são iguais ao nível de significância de 5%, significando que existe diferença nos tratamentos.

**Tabela 19:** Análise de variância entre os grupos testados para citotoxicidade frente aos macrófagos

Fonte da Variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	845,84770	8	105,73096	12,7399	000.1	2,9364
Dentro dos grupos	373,46321	45	8,29918			
Total	1219,31090	53				

O Teste de Tukey foi realizado para comparar as médias entre os tratamentos (Tabela 20). A partir das análises constata-se que existe diferença entre o tratamento com o OEFCL, ORCL e com as nanoemulsões, sendo esta última um pouco menos citotóxica aos macrófagos.

**Tabela 20:** Teste de Tukey realizado para os tratamentos de citotoxicidade frente aos macrófagos

<b>Tratamento</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Diferença mínima Significativa (dms)</b>
DMSO	93,87750	1,994665	
R 11	88,03333	1,927231	
R 12	83,91900	0,696959	
R 13	85,85783	1,249078	
F 11	85,69033	1,231008	5,41395
F 12	87,23867	2,007496	
F 13	88,41000	1,929229	
OERCL	86,38766	7,397161	
OEFCL	96,86200	0,984109	

Levando em consideração as médias e os desvios padrão, estatisticamente os valores estão consistentes, mesmo para o OERCL que apresentou desvio padrão de 7,397161.

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que os estudos com os OECL devem continuar com uma perspectiva de desenvolvimento de novas NE, justificado pela capacidade da NE conseguir migrar para lugares da célula que o óleo, devido às suas propriedades hidrofóbicas, não penetra, desta vez, no entanto, com uso de tensoativos diferentes e diminuindo a concentração do OECL, a fim de se melhorar a estabilidade das NE.

#### **4.8 Avaliação do teste de atividade antibacteriana**

O OEFCL e o OERCL, bem como os sistemas nanoemulsionados foram testados (teste de sensibilidade por difusão em disco no meio ágar Müller-Hinton) em relação às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Em cada análise o resultado foi obtido observando se havia um halo de inibição de três amostras e foi feita a média, para compará-las entre os tratamentos contra as bactérias, a partir das amostras do OEFCL e OERCL e as NE.

Quanto à bactéria *Staphylococcus aureus* a Tabela 21 apresenta os resultados dos valores do diâmetro dos halos de inibição do óleo essencial da folha da *C. longa* (OEFCL), bem como sua média, para o óleo essencial do rizoma da *C. longa* (OERCL) o resultado foi negativo e para as NE também.

**Tabela 21**– Resultado antibacteriano em disco de difusão para o tratamento da *Staphylococcus aureus* com o óleo essencial da folha da *Curcuma longa* (OEFCL) e as nanoemulsões produzidas com o OEFCL

	OEFCL	EHL F11	EHL F12	EHL F13
<b>Halo de inibição (mm)</b>	10	0	0	0
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

No que se refere aos resultados obtidos no teste com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* as Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados dos valores do diâmetro dos halos de inibição, bem como sua média.

**Tabela 22**– Resultado antibacteriano em disco de difusão para o tratamento da *Streptococcus pneumoniae* com o óleo essencial da folha da *Curcuma longa* (OEFCL) e as nanoemulsões produzidas com o OEFCL

	OEFCL	EHL F11	EHL F12	EHL F13
<b>Halo de inibição (mm)</b>	10	0	0	0
<b>Média</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabela 23**– Resultado antibacteriano em disco de difusão para o tratamento da *Streptococcus pneumoniae* com o óleo essencial do rizoma da *Curcuma longa* (OERCL) e as nanoemulsões produzidas com o OERCL

	OERCL	EHL R11	EHL R12	EHL R13
<b>Halo de inibição (mm)</b>	10	0	0	0
<b>Média</b>	<b>8,66667</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

De acordo com a análise da média das análises feitas com o OEFCL e OERCL nas Tabelas 21, 22 e 23 compreende-se que os resultados são positivos para a ação bacteriostática ou antibacteriana.

O OEFCL e o OERCL, bem como as NE formuladas para cada óleo essencial não apresentaram atividade antibacteriana para as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella*

*pneumoniae*. Resultado diferente do trabalho de Souza (2015) que utilizou o óleo essencial de canela (óleo essencial de *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil OECHVG) e nanoemulsões com EHL diferentes, o OECHVG acabou promovendo um halo de inibição com média de 35 mm contra *Staphylococcus aureus*, média de 35 mm contra a *Streptococcus pneumoniae*, média de 29,7 mm contra a *Escherichia coli* e média de 20 mm contra a *Klebsiella pneumoniae*. As nanoemulsões tiveram maior atividade contra a *Escherichia coli* e quase não foi registrada ação contra a *Klebsiella pneumoniae*.

No trabalho em que Maia et al. (2004) realizaram um experimento com o extrato alcoólico do rizoma de *C. longa* em ricota frente às bactérias *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, o extrato alcoólico mostrou possuir a propriedade de reduzir o número de *E. coli* e *E. aerogenes* inoculadas na ricota. Fedes; Gonçalves (2014) fizeram um extrato etanólico por turboextração do rizoma de *C. longa* e obtiveram o OE por hidrodestilação. Somente o OE foi eficaz na inibição do crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*, além disso mostrou-se promissor para usos diversos com finalidade antibacteriana concluindo que o OERCL é composto principalmente por tumerona, dihidrotumeronas e cetonas aromáticas (zingibereno,  $\alpha$ -felandreno, sabineno, cineol e boneol). Maróstica Junior; Pastore (2007) afirmam que o limoneno, ou 4-isoprenil-1-metilciclohexeno, é um monoterpene monocíclico e tem a função de prevenir a desidratação e a inibição de crescimento microbiano, sua função natural nos vegetais.

Fagbemi et al. (2009) fizeram extratos com álcool à 70% e extrato aquoso de rizoma de *C. longa* e os experimentaram com cinco cepas Gram-negativas: *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnerii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e duas Gram-positivas: *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, os resultados mostram que o extrato etanólico teve atividade bactericida a partir de 14 mm para *E. coli* e 26 mm em *B. subtilis*, a concentração mínima inibitória foi de 2 mg/mL. Para *S. paratyphi*, *S. flexnerii*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* o extrato alcoólico teve apenas efeito bacteriostático. O extrato aquoso teve efeito bactericida somente em *S. aureus*, mostrando-se bacteriostático para os outros organismos, concluindo que algumas das substâncias ativas desta planta medicinal são bem mais dissolvidas em etanol do que em água.

Niansa; Sittiwet (2009) testaram a atividade do extrato aquoso do rizoma de *C. longa* L. em cinco cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarium*) e cinco cepas Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa*), mostrando inibição contra *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *S. epidermidis*. Logo, chegaram à conclusão de que a curcumina mostrou fraco efeito de inibição contra *P. aeruginosa*, devido

à inconsistência da abundância natural da curcumina em cada estação. Os resultados indicaram que o extrato aquoso mostrou atividade antibacteriana contra: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *S. epidermidis* em baixa concentração ( $125 \text{ g/L}^{-1}$ ) e afirma que o OERCL é rico em Ar-tumerona e o extrato aquoso é rico em curcumina.

No entanto, no trabalho realizado por Kim et al. (2005) foi obtido o extrato do rizoma de *C. longa*, usando como solvente o metanol, o acetato de etila e água. O extrato de acetato demonstrou ter uma maior atividade inibitória que o extrato de metanol e de água em cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos como a ampicilina e a oxacilina, sugerindo que o acetato pode ser um melhor solvente que o metanol e que a água. Baseados em estudos anteriores, os autores deste artigo admitem que possivelmente neste experimento o acetato de etila extraiu flavonóides de *C. longa* e que há vários relatos de que alguns compostos pertencentes aos flavonóides têm atividade bactericida.

Singh et al. (2002) fizeram experimentos com as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e as bactérias Gram-negativas: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Salmonella typhimurium* usando extrato aquoso, extrato de clorofórmio, extrato de metanol e o óleo essencial de rizomas de *C. longa* L. Para as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* apenas o óleo essencial mostrou mais atividade que os antibióticos padrões utilizados (ampicilina, eritromicina, gentamicina e doxiciclina), o OE mostrou atividade moderada contra *E. coli* e *S. typhimurium*, neste mesmo estudo os pesquisadores chegaram ao consenso de que o OE é mais efetivo contra as bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas e que o OERCL possui significativa atividade antibacteriana até mesmo em baixa concentração ( $20 \mu\text{g}/\text{disco}$ ).

Os resultados dos trabalhos descritos apresentaram variações entre a atividade bacteriostática e bactericida frente às cepas Gram-positivas e Gram-negativas, onde foram usados vários tipos de extratos e soluções, alguns dos resultados apresentaram atividade antibacteriana apenas contra cepas Gram-positivas que foi o resultado encontrado no presente trabalho, onde o OEFCL e OERCL apresentaram halos de inibição apenas para bactérias Gram-positivas o que indica que os estudos com os OECL devem continuar com uma perspectiva de desenvolvimento de novas NE, com o uso de tensoativos diferentes, podendo associar o OECL a outros compostos.

## 5. CONCLUSÕES

A coleta de rizomas e folhas de *Curcuma longa* L. feita em Vila Campinas, no município de Plácido de Castro, estado do Acre, possibilitou a extração dos óleos essenciais por meio de hidrodestilação. Sendo o rendimento total do OEFCL de 5,2 mL e do OERCL 13 mL.

Foram desenvolvidas NE com 5% do OEFCL e OERCL, com EHL variando de 11 a 13, pelo método de emulsificação ultrassônica com tamanho e estabilidade aceitáveis. As quais foram caracterizadas pelo potencial zeta, que indicou que as NE são pouco estáveis e que com o passar do tempo as gotículas podem se aglomerar formando populações diferentes dentro da NE, com o IP acima de 0,200 nm.

As análises do espectro Raman mostraram que nos dois óleos os compostos são ricos em grupo metila e metileno e também anéis aromáticos.

A análise por espectroscopia IV-TF para o OEFCL sugere grupos funcionais do tipo alceno, benzeno e cetona. Já para o OERCL os grupos podem ser alceno, alceno, benzeno, olefina, cetona, aril/alquil/éter e aril/alquil/amina.

A análise do espectro UV-Vis do OEFCL apresentou apenas um pico de  $\lambda_{\max}$ . 235nm, sugerindo um composto cromófora, dieno bicíclico, com aparência do isopreno, possivelmente indicando que seja o composto monoterpeneo  $\alpha$ -felandreno. A análise do OERCL apresentou um pico de  $\lambda_{\max}$ . de 236 nm, faixa de absorção de compostos poli-insaturados aromáticos, sugerindo que seja o monoterpeneo m-cimeno ou o sesquiterpeneo Curcumeno.

A análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) do OEFCL apresentou 24 composto, sendo os principais constituintes: o  $\alpha$ -felandreno (27,37%), Terpinoleno (21,66%), Eucaliptol (12,72%) e O-cimeno (7,0 %),  $\beta$ -pireno (4,40%),  $\beta$ -farneseno (3,17%), 8-Cimeno-8-ol (3,0%), Ar-tumerona (2,48%), Mirceno (2,37%),  $\alpha$ -pireno (1,71%),  $\alpha$ -tumerona (1,64%),  $\beta$ -tumerona (1,42%),  $\alpha$ -farneseno (1,41%), L-linalol (1,38%),  $\gamma$ -terpireno (1,34%), Dióxido de limoneno (1,09%), 3-Isopropil-4-metil-1-pentil-3-ol (1,07%), 4-Formiciclohexano (1,02%) e outros. O OEFCL é composto em sua maioria por monoterpeneos com 8 compostos desta classe ( $C_{10}H_{16}$ ), representando 33,3%, 5 monoterpeneóides ( $C_{10}H_{18}O$ ) (20,83%), sesquiterpeneo apresentando 2 compostos dessa classe ( $C_{15}H_{24}$ ), o que representa 8,33% do óleo. O OEFCL apresenta ainda em sua constituição 5

compostos sesquiterpnóides ( $C_{15}H_{22}O$ ) (20,83%), 1 composto diterpenóide ( $C_{20}H_{12}$ ) e outros 3 compostos (12,5%).

O OERCL apresentou 11 compostos: Ar-tumerona (34,20%),  $\beta$ -tumerona (20,44%),  $\alpha$ -tumerona (15,95%), Eucaliptol (9,65%),  $\alpha$ -felandreno (8,02%), Terpinoleno (2,42%), m-cimeno (2,47%),  $\beta$ -sesquifelandreno (2,16%), Zingibereno (1,87%), Dietilftalato (1,71%) e Curcumeno (1,31%). O OERCL apresentou seus compostos monoterpenos (3), sesquiterpenos (3) e sesquiterpenóides (3) equilibrados representando 27,27% cada, 1 monoterpenóide (9,09) e 1 outro composto (9,09%).

Apenas 7 compostos estão presentes nos dois óleos essenciais sendo: o  $\alpha$ -felandreno, o Eucaliptol, o Terpinoleno, o Dietilftalato, a  $\beta$ -tumerona, a Ar-tumerona e a  $\alpha$ -tumerona. A maioria dos compostos foram encontrados também em outros trabalhos de pesquisa sobre o OEFCL e OERCL dando confirmação a este trabalho.

O OEFCL, o OERCL e as nanoemulsões testadas em macrófagos de camundongos apresentaram-se citotóxicos. E sugere novos estudos com novas NE formuladas com EHL e tensoativos diferentes e em concentrações diferentes dos OECL, tendo em vista que as NE possuem propriedades capazes de penetrar em locais da célula nos quais o óleo não chega.

E em testes antibacterianos com as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* nenhuma das NE tiveram qualquer efeito bacteriostático ou antibacteriano.

OEFCL teve halo de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, bactérias Gram-positivas, analisando as médias, o resultado foi conclusivo para atividade bacteriostática ou antibacteriana.

O OERCL apresentou halo de inibição apenas para a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, sendo um resultado conclusivo para a atividade bacteriostática ou antibacteriana.

Os resultados sugerem o desenvolvimento de novas NE com tensoativos e EHL diferente e com concentração de OECL maior.

## REFERÊNCIAS

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.

ÁLVARES, V. S.; SILVA, R. S.; CUNHA, C. R.; FELISBERTO, F. A. V.; CAMPOS-FILHO, M. D. Efeito de diferentes concentrações de corante Natural de Açafreão-da-terra na composição da farinha de mandioca artesanal. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 8, n.1, p. 256-262, jan. – mar. 2015.

ALENCAR, E. D. N. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas emulsionados contendo óleos naturais para o tratamento de infecções cutâneas**. 2013.

ALI, A.; WANG, Y.-H.; KHAN, I. A. Larvicidal and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of *Curcuma longa*, Ar-turmerone, and Curcuminoids Against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 979-986, Sep 2015.

AMMON, H. P. T.; ANAZODO, M.I.; SAFAYHI, H.; DHAWAN, B. N.; SRIMAL, R.C. 1992. Curcumin: a potent inhibitor of Leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). **Planta Med** 58: 26.

ANDRADE, M. A. Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana. 2013.

ANUBALA, S.; SEKAR, R.; NAGAI AH, K. Development and validation of an analytical method for the separation and determination of major bioactive curcuminoids in *Curcuma longa* rhizomes and herbal products using non-aqueous capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 123, p. 10-7, Jun 2014. ISSN 1873-3573 (Electronic)

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96: 723-728.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M. E. F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L. L. 1999. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94:791-794.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; CASTRO, D.; LIMA, M. E. F.; LEON, L. L. 1998. *Leishmania amazonensis*: *in vivo* experiments with diarylheptanoids from Leguminosae and Zingiberaceae plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 93 (Suppl. II): 306.

ARORA, R. B.; BASU, N.; KAPOOR, V., JAIN, A. P. 1971. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (Turmeric). **Indian J Med Res** 59: 1289-1295.

BAHL, J. R. *et al.* Variation in Yield of Curcumin and Yield and Quality of Leaf and Rhizome Essential Oils among Indian Land Races of Turmeric *Curcuma longa* L.

**Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 1, p. 143-156, Mar 2014. ISSN 0370-0046. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD201400293277 >.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro, por esxtratos de *Curcuma longa* e Curcumina-I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatol. Bras.** 31(3), p. 310-314, maio-jun. 2006.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (EE.) **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. New York: Taylor & Francis Group, 2010. 994 p.

BECHER, P. **Emulsions: Theory and Practice**. 3. Ed. New York: Oxford University Press. 2001.

BHAVANI SANKAR, T. N.; MURTHY, S. 1979. Effect of Turmeric (*Curcuma longa*) fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria *in vitro*. **Indian J Exp Biol** 17: 1363-1366.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12 (2): 123-130, maio/ago., 1999.

BRAGA, M. E. M. **Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia Alba* M. por tecnologia super crítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo**. Campinas, SP: [s.n.] 2005. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 1, n. 5<sup>a</sup>, p. 545, 2010.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, B. M.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoelmusões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quim. Nova**, v. 35, n°9, 1827-1840, 2012.

CALDEIRA, L. R. **Nanoelmulsões carregadas com anfoteracina B para o tratamento das leishmanioses: uma nova abordagem**. 2011. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

CASTRO, P. R. C; KLUGE, R. A.; PERES, L.E. P. **Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática**. 1<sup>a</sup> edição. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CAZO, N. A.; P.F., EDENIR R.; DA SILVA, MARIA F. G. FERNANDES; FERNANDES JOÃO BATISTA; VIEIRA, PAULO CEZAR; PUHL, ANA C.; POLIKARPOV, IGOR FORIM, MOACIR ROSSI; Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 02, abril-junho 2012.

CECÍLIO-FILHO, A. B.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. Cúrcuma: plantamedicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.171-175, 2000.

CECÍLIO-FILHO, A. B. **Época e densidade de plantio da cúcuma (*Curcuma longa*)**. Lavras-MG, 1996. 100 p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.

CHANDRA, D.; GUPTA, S.S. 1972. Anti-inflammatory and antiarthritic activity of volatile oil of *Curcuma longa* (Haldi). **Indian J Med Res** 60: 138-142.

CHASSAGNEZ-MÉNDEZ, A. L. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Curcumins and Essential Oil from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p. 4729-4733, 2000.

CHATTOPADHYAY, I.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R. K. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Current Science**, v. 87, n. 1, p. 44-53, 10 July 2004.

CHOPRA, R.N.; GUPTA, J. C.; CHOPRA, G. S. 1941. Pharmacological action of the essential oil of *Curcuma longa*. **Indian J Med Res** 29: 769-772.

CHUANG, S. E.; CHEN, A. L.; LIN, J. K.; KUO, M. L. 2000. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. **Fd Chem Toxicol** 38: 991-995.

COSTA, A. O. **ÓLEO ESSENCIAL DE *Lantana camara* Linn: CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO E ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA**. Rio Branco, 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em ciência, inovação e tecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre.

COSTA, L. H. N.; LIMA, F. J. S.; SILVA, A. O. Espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis para os ligantes Quinolina-N-Óxido, Nicotinamida-N-Óxido E 2,2-Dithiobispiridina-N-Óxido **55º Congresso Brasileiro de química**. Recursos Renováveis: Inovação e Tecnologia. Goiânia: Goiás. 02 a 06 de novembro de 2015.

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

DAO, T. T. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* and their inhibitory activities on influenza A neuraminidases. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 21-28, 2012.

DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; DIAS-FILHO, N. L.; DE PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. **Quim. Nova** 2010, 33, 65.

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

EIGNER, D.; SCHOLZ, D. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. **J. Ethnopharmacol** 67: 1-6.

FAGBEMI, J. F.; UGOJI, E.; ADENIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, O. Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientrum* L.), lemongrass (*Cymbopogon*

*citratu*s) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens. **African Journal of Biotechnology**. V. 8 (7), p. 1176-1182, 6 april, 2009.

FARIA, F. S. E. D. V. **Secagem Convectiva de Sacaca (*Croton cajucara* Benth) - Análise Experimental da Influência de Variáveis de Entrada no Rendimento em Óleo Essencial, Umidade Final e Teor de Linalol**. 2008. 175f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

FEDES, G. R.; GONÇALVES, G. M. S. **Estudo de atividade antimicrobiana de subprodutos provenientes dos rizomas de *Curcuma longa***. Anais do XIX Encontro de Iniciação Científica. Anais do IV Encontro de Iniciação e Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. 23 e 24 de setembro de 2014.

FERREIRA, F. D. et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 789-93, Jan 15 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122128> >.

FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; MORAES, V. L. G. 1992. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon** 30: 1211-1218.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M.A.V.; LEGRAND, J. Effect of high Pressure homogenization on methycellulose as food emulsifier. **Journal of Food Engineering**, v.58, n.3, p.227-238, 2003.

GHATAK, N.; BASU, N. 1972. Sodium curcumin as an effective anti-inflammatory agent. **Indian J Exp Biol** 10: 235-236.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 4, p. 787-809, Feb 15 2008. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900536> >.

GOVINDARAJAM, V.S. Turmeric – Chemistry, technology and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, p. 199-301, 1980.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-active Agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.1, n.5, p. 311-326, dez. 1949.

GUPTA, P. K.; CANNON, J. B. **Emulsions and microemulsions for drug solubilization and delivery**. In: R. Liu (Ed.). *Water-Insoluble Drug Formulation*. Colorado: Interpharm Press, 2000. p. 169-211.

HERTWIG, L.F. V. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo: Icone, p.254-265, 1986.

HIGUCHI, W.; MISRA, J. Physical degradation of emulsions Via the Molecular diffusion route and the possible prevention thereof. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 5, p. 459-466, 1962.

HUANG, H. C.; JAN, T. R.; YEH, S. F. 1992. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. **Eur J Pharmacol** 221: 381-384.

HUANG, M. T.; LYSZ, T.; FERRARO, T.; ABIDI, T. F.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. 1991. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. **Cancer Res** 51: 813-819.

HUANG, M. T.; SMART, R. C.; WONG, C. Q.; CONNEY, A. H. 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Res** 48: 5941-5946.

IRANSHAHI, M.; CHINI, M. G.; MASULLO, M.; SAHEBKAR, A.; JAVIDNIA, A.; YAZDI, M. C.; PERGOLA, C.; KOERBELE, A.; WERZ, O.; PIZZA, C.; TERRACCIANO, S.; PIACENTE, S.; BIFULCO, G. Can small chemical modifications of natural pan-inhibitors modulate the biological selectivity? The case of curcumin prenylated derivatives acting as HDAC or mPGES-1 inhibitors. **J. Nat. Prod.** DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00700.

ISLAM, A. **Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for *in vitro* regeneration and long-term conservation of *C. longa* germplasm.** PhD thesis, Biological Institute, University of Hannover, Alemanha, 137 p., 2004.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-emulsions production by sonication and microfluidization- A comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475-485, 2006.

JATO, J. **Aspectos fundamentales de los sistemas farmacêuticos y operações básicas.** Madrid: Editorial Sintesis. 1997.

JAYAPRAKASHA, G. K. *et al.* Chemical Composition of turmeric oil - A byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi. **Z. Naturforschung**, v. 56c, p. 40-44, 2000.

JOSEPH, R.; JOSEPH, T.; JOSE, J. Karyomorphological studies in the genus *Curcuma* Linn. **Cytologia**, v.64, p.313-317, 1999.

JUNIOR, P. A. **Espectroscopia Molecular.** Universidade Federal do Pará: 5 p. 2002.

KABALNOV, A. S.; SHCHUKIN, E. D. Ostwald ripening Theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. **Advances in Colloids and Interface Science**, v. 38, n. 1, p. 69-97, mar. 1992.

KABALNOV, A. S.; WENNERSTROM, H. Macroemulsions stability: The oriented wedge theory revisited. **Langmuir**, v. 12, n. 2, p. 276-292, 1996.

KIM, K. J.; YU, H. H.; CHA, J. D.; SEO, S. J.; CHOI, N. Y.; YOU, Y. O. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**. 19, p. 599-604, 2005.

KIUCHI, F.; GOTO, Y.; SUGIMOTO, N.; AKAO, N.; KONDO, K.; TSUDA, Y. 1993. Nematocidal activity of Turmeric: synergistic action of curcuminoids. **Chem Pharm Bul** 41: 1640-1643.

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

KOEBERLE, A.; MUNOZ, E.; APPENDINO, G. B.; MINASSI, A.; PACE, S.; ROSSI, A.; WEINIGEL, C.; BARZ, D.; SAUTEBIN, L.; CAPRIOGLIO, D.; COLLADO, J. A.; WERZ, O. J. **Med. Chem.** 2014, 57, 5638–5648.

KOPLÍK, R. **Advanced strategies in food analysis: Ultraviolet and visible spectrometry.** On line, 2000. Disponível em: <[http://web.vscht.cz/~poustkaj/EN%20ASFA%20AU%20Kopl%C3%ADk%20UV\\_VIS\\_spectrometry.pdf](http://web.vscht.cz/~poustkaj/EN%20ASFA%20AU%20Kopl%C3%ADk%20UV_VIS_spectrometry.pdf)> Acesso em: 07/10/2015.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STARGALIN, J. R.; ÁGUILA, R. M. D.; SCHUWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* p.v. *manihotis*. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2006.

LEUNG, M. H. M.; HARADA, T.; DAI, S.; KEE, T. W. Nanoprecipitation and spectroscopic characterization of curcumin-encapsulated polyester nanoparticles. **Langmuir**. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02773. 2015.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia.** 7ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems.** New York: Marcel Dekker, 1989.

LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems.** New York: Marcel Dekker, 1988.

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

LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; PIANNOVSK, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Rev. Bras. Farm.** 89 (3): 239-245. 2008.

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

MAIA, N. B.; BOVI, O. A.; DUARTE, F. R.; SORIA, L. G.; ALMEIDA, J.A. R. Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de cúrcuma. **Bragantia**, v.54, n.1. p. 33-37, 1995.

MAIA, N. B. A cúrcuma como corante. In: **Seminário de corantes naturais**, ITAL, Campinas, 65p, 1991.

MAIA, S. R.; FERREIRA, A. C.; ABREU, L. R. D. USO DO AÇAFRÃO (*Curcuma longa* L.) NA REDUÇÃO DA *Escherichia coli* (ATCC 25922) E *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) EM RICOTA. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 28, n. 2, p. 358-365, mar./abr. 2004.

MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V. P.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de franco resfriado. **Rev. Bras. Pl. Med.** Campinas, v. 16, n. 3, p. 505-512, 2014.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de Limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Quim. Nova.** 30(2), p. 382-387, 2007.

MARTINS, M. C.; RUSIG, O. Cúrcuma – um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 53-65, 1992.

MAZUMBER, A.; RAGHAVAN, K.; WEINSTEIN, J.; KOHN, K.W.; POMMER, Y. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochem Pharmacol** 49: 1165-1170.

MEDRANO, J. J. A.; RODRIGUEZ, A. F. R. Sínteses, caracterização Físico-Química, espectroscópica e cromatográfica do óleo essencial de *Croton cajucara* Benth. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 66., 2014, Rio Branco. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFAC, 2014. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/66ra/resumos/resumos/6709.htm>>. Acesso em: 16/09/2015.

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

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsion: Principles, Practices and Techniques**. Second Edition. Boca Raton: CRC Press. 2005.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: Principles, practice, and techniques**. Boca Raton: CRC Press. 1999. 378p.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. International Thomson Editores, 2004. ISBN 9706863540.

MILLER, C.A. Spontaneous emulsification recent developments with emphasis on self-emulsification. In: SJOBLOM, J. (ed.) **Emulsions and Emulsion Stability: Surfactant Science Series**. 2. Ed. v. 132. New York: CRC Press, 2006. p. 107-126.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. T. J. **Pharm. Res.** 2006, 5, 561.

MORAIS, J.M.; SANTOS, O.D.H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R.A.; ROCHA FILHO, P.A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2006.

MUKOPHADHYAY, A.; BASU, N.; GHATAK, N.; GUJRAL, P. K. 1982. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents and Actions** 12: 508-515.

NATRAJAN, D. et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 560-568, Sep 2015. Disponível em: <WOS:000361256900027 >.

NCCLS. **Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada**. 8 ed. NCCLS, Pensilvânia, Estados Unidos da América. 58 p. 2003.

NIANSA, N.; SITTIWET, C. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. **Journal of Pharmacology and Toxicology**. 2009.

NIST- National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> Acesso em: 17/11/2015.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, R. D. NOTA SOBRE A KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUTORA DE CARBAPENEMASE-KPC. On line, 2011. Disponível em: <[http://www.saude.mt.gov.br/upload/controle-infeccoes/pasta3/nota\\_estadual\\_sobre\\_klebsiella\\_pneumoniae\\_produtores\\_de\\_carbapenemas\\_kpc.pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/controle-infeccoes/pasta3/nota_estadual_sobre_klebsiella_pneumoniae_produtores_de_carbapenemas_kpc.pdf)>. Acesso em: 07/10/2015.

OZAKI, K.; KAWATA, Y.; AMANO, S.; HANAZAWA, S. 2000. Stimulatory effect of curcumin on osteoclast apoptosis. **Biochem Pharmacol** 59: 1577-1581.

PARK, E. J.; JEON, C. H.; KO, G.; KIM, J.; SOHN, D. H. 2000. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. **J Pharm Pharmacol** 52: 437-440.

PARRY, J. W. **Spices: morphology, histology, chemistry**. New York: Chemical, 1969. v. 2, p. 74-78.

PETSEV, D.; DENKOV, N.; KRALCHEVSKY, P. Flocculation of deformable Emulsion droplets. II. Interaction energy. **Colloid and interface Science**, v. 176, n. 1, p. 201-213. 1995.

PULLA REDDY, A. C. H.; LOKESH, B. R. 1994. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Fd Chem Toxic** 32: 279-283.

PULLA REDDY, A. C. H.; LOKESH, B. R. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Mol Cell Biochem** 111: 117-124.

RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KARAZMI, A. 2000. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. **Planta Med** 66: 396-398.

RAVINDRAN, P.N.; BABU, K.N.; SIVARANAN, K. Turmeric: The genus *Curcuma*. **Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles**. CRC press, 484 pp., 2007.

REUSCH, W. **Visible and Ultraviolet Spectroscopy**. On line, 2013. Disponível em <<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UVVis/spectrum.htm>> Acesso em: 07/10/2015.

ROCHA, F. R. et al. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

ROHAETI, E.; RAFI, M.; SYAFITRI, U. D.; HERIANTO, R. Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometrics for discrimination of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumara*. **Elsevier B. V.** 1386-1425. 2014.

ROUGHLEY, P. J.; WHITING, D. A. Experiments in Biosynthesis of Curcumin. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.** Vol.1, p. 2379–2388, 1973.

SALVI, N. D.; GEORGE, L.; EAPEN, S. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. **Plant Cell Tissue**, n.68, p. 143-151, 2002.

SASIKUMAR, B. Genetic resources of *Curcuma*: diversity, characterization and utilization. **Plant Genetic Resources**, v.3, n.2, p. 230-251, 2005.

SASIKUMAR, B.; KRISHNAMOORTHY, B.; SAJI, K.V.; GEORGE, J.K.; PETER, K.V.; RAVINDRAN, P.N. Spice diversity and conservation of plants that yield major spices in India. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 118, p.19-26, 1999.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **J Ethnopharmacol** 71: 23-43.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIRMER, R. E. **Modern Methods of Pharmaceutical Analysis**. Second edition. Boca Raton: CRC Press. 1990.

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

SERRANO, I. D. Contribuição para a caracterização da população de *Streptococcus pneumoniae* causadora de infecções graves. 2007.

SHARMA, S. K.; LOWE, K. C.; DAVIS, S. S. Novel Compositions of Emulsified Perfluorochemicals for Biological Uses. **Biomaterials, Artificial Cells, and artificialorgans**, v. 16, p. 447-450, 1988.

SHINODA, K. H. KUNIEDA. Phase properties of emulsions: PIT and HLB, in: P. Becher (Ed.), **Encyclopedia of emulsion technology**, vol. 1. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 337-367.

SHINODA, K. H.; SAITO. The effect of temperature on the phase equilibrium and the types of dispersion of the ternary system composed of water, cyclohexane, and non ionic surfactant. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 70-74, 1968.

SHIRGURKAR, M.V.; NAIK, V.B.; ARNOLD, S.; NADGAUDA, R.S.; CLAPHAM, D. An efficient protocol for genetic transformation and shoot regeneration of turmeric (*Curcuma longa* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.25, n.2, p. 112-116, 2006.

SIGRIST, M. S. **DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM *Curcuma longa* L. UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES E AGROMORFOLÓGICOS**. Campinas, SP: 2009. 82 p. DISSERTAÇÃO (Mestrado em agronomia) - PÓS-GRADUAÇÃO, INSTITUTO AGRONÔMICO.

SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemina salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacologia** 19 (4): 919-923, Out./Dez. 2009.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15, p. 2038-2052, 2012.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Rio de Janeiro: LTC editora, 2013. ISBN 978-852161521-7.

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. New York: John Wiler & Sons, 2005. 210 p.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v. 86, n. 6, p. 737-740, september 2002.

SOUZA, C. A. L. **Óleo essencial de *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil: caracterização, desenvolvimento de nanemulsão e estudo da atividade microbiológica**. Rio Branco, 2015. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) – Programa de Pós-graduação: Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre.

SREEJAYAN, R. A. O. M. N. 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. **J Pharm Pharmacol** 46: 1013-1016.

SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N. 1973. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. **J Pharm Pharmacol** 25: 447-452.

SRIVASTAVA, S. K.; RAINA, V. K.; SYAMSUNDAR, K. V. Rhizome and Leaf Oil Composition of *Curcuma longa* from the lower Himalayan Region of Northern India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. September/October, 2005.

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

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A.M.; USÓN, N.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nanoemulsions: formation, properties, and applications. **Journal of Adsorption and agregation of surfactants in solution**, v. 109, n. 1, p. 524-554, 2003.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a New Vehicle for Skincare Products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108/109, p.145-149, mar. 2004.

SUNILSON, J. A. J.; SURAJ, R.; REJITHA, G.; ANANDARAJAGOPAL, K.; KUMARI, A. V. A.D.; PROMWICHIT, P. *In vitro* antimicrobial evaluation of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* and *Alpinia galaga* extracts as natural food preservatives. **American Journal of Food Technology**. 4 (5): 192-200, 2009.

TADROS, T. F. (Ed.). **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim: Wiley-VCH. 2013. 272p.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and Stability of Nanoemulsions. **Advances in Colloids and Interfase Science**, vol 108/109, p. 303-318, mai. 2004.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 75, n. 2, p. 107-163, 1998.

UNNIKRISHNAN, M. K.; RAO, M. N. 1995. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. **Pharmazie 50**: 490-492.

VALOIS, A.C.C.; PAIVA, J.R.; FERREIRA, F.R.; SOARES FILHO, W.S.; DANTAS, J.L.L. Melhoramento de espécies de propagação vegetativa. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p.283-292, 2001.

VAN VELTHEM; HUSSAK, L. A “farinha especial”: fabricação e percepção de um produto da agricultura familiar no vale do rio Juruá, Acre. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, v. 7, n. 2, p. 435-456, 2012.

VERWEY, E.; OVERBEEK, J. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. Amsterdam: Elsevier. 1948. 216 p.

WAGNER, C. Physycal degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention therefore. **Pharmaceutica Sciences**, v. 51, n. 5, p. 459-466, 1961.

WALKER, J. et al. **Fundamentos de física: volume 4: óptica e física moderna**. LTC, 2009.

WALSTRA, P.; DERKER, M. Emulsion stability. In: Paul Becher (Ed.). **Encyclopedia of emulsion technology**. New York: CRC Press. 1996. v. 4, p. 1-62.

WEN, L.; PAPADOPOULUS, 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, mar. 2001.

WEERS, J. G.; NI, Y.; TARARA, T. E.; PELURA, T. J.; ARLAUSKAS, R. A. The effect of molecular diffusion on initial particle size distributions in phospholipid stabilized fluorocarbon emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 84, n. 1, p. 81-87, 1994.

WOLFFENBÜTTEL, A. N; **Óleos Essenciais.** Informativo CRQ-V, ano XI, nº 105, novembro/dezembro/ 2007, p. 06 e 07.

YOUNG, H. D. et al. Física III: eletromagnetismo. **12º edição. Editora Pearson Addison Wesley**, v. III, 2008.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and Stability Evaluation of  $\beta$ -carotene Nanoemulsions prepared by High Pressure Homogenization under Various Emulsifying Conditions. **Food Research International**, v.41, n. 1, p. 61-68, 2007.

ZWAVING, J.H.; BOSS, R. Analysis of the essential oils of five Curcuma species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p.19–22, 1992.