

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL
DE FOLHAS DE *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: AVALIAÇÃO DA
SAZONALIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

JANAÍNA BRANDÃO SEIBERT

OURO PRETO

2015

JANAÍNA BRANDÃO SEIBERT

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL
DE FOLHAS DE *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: AVALIAÇÃO DA
SAZONALIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David
Henrique dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Henrique Bianco de Souza

OURO PRETO

2015

S457d

Seibert, Janaina Brandão.

Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf. [manuscrito]: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas / Janaina Brandão Seibert. - 2015.

xix, 83f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Antioxidantes. 2. Sazonalidade. 3. Nanoemulsão. 4. Antimicrobianos. I. Santos, Orlando David Henrique dos. II. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.322

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*: Avaliação da sazonalidade e atividades biológicas”

Aos doze dias do mês de março de 2015, às 13h30min, no Auditório do Bloco de Salas de Aula da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Janaína Brandão Seibert**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por A PRO JAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

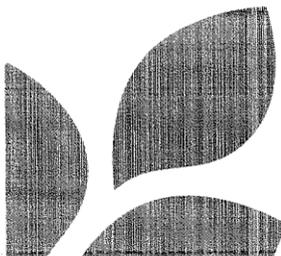
Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos
Orientador

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição
Examinador (UFG)

Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 12/03/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

A Deus, por ter me proporcionado a vida e a
capacidade de aprendizado;

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor e incentivo
oferecidos incondicionalmente em todos os
momentos e sobretudo neste;

Aos amigos pelo companheirismo;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da vida e por sempre se fazer presente me guiando e iluminando meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos e ao meu co-orientador Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pelo apoio e por ter acreditado na minha capacidade. Esse trabalho é nosso!

Ao Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho pelo auxílio na avaliação da alelopatia, Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira por permitir a utilização do Laboratório de Microbiologia e assessoramento na pesquisa da atividade antimicrobiana, Prof^a. Dr^a. Andréa Mendes do Nascimento pela contribuição nos estudos da sazonalidade e Prof. Dr. José Mario Barichello pela colaboração.

Ao laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), por disponibilizar a utilização do aparelho de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa, proporcionando assim, a obtenção dos meus resultados e a Dr^a. Ivanildes Vasconcelos pela ajuda nas análises. Nildes, obrigada pela amizade, pela paciência, pela troca de experiência, pela dedicação, pela disposição em me ajudar sempre e, sobretudo, pelos ensinamentos de vida e trabalho, devo tudo isso a você!

Aos amigos do laboratório de Fitotecnologia, Tatiane Roquete Amparo, Fernanda Coelho, Tamires Cunha Almeida, Regislainy Gomes da Silva, Simone Pinto Carneiro, Luana Christian Gonçalves da Silva, Lucas Andrade Ferreira e Fernanda Barçante Perasoli que fizeram do trabalho mais um motivo para aprendizado e diversão. Com vocês isso tudo se tornou mais fácil.

Aos meus pais, João Luiz Seibert e Cláudia Maria Archanjo Brandão Seibert, pelo amor e carinho dedicados em todos esses anos e pelo apoio e incentivo dados incondicionalmente para que eu tivesse condições de lutar pelos meus sonhos e alcançar todos os meus objetivos, abdicando de suas próprias vidas para que hoje eu pudesse estar aqui. Obrigada pelos ensinamentos de vida e lições de moral que me fizeram ser quem sou hoje. Saibam que reconheço seus esforços e que serei eternamente grata por

tudo que me proporcionaram e espero recompensá-los em dobro. Meu orgulho são vocês!

Ao meu irmão Jardel Brandão Seibert, que mesmo a distância sempre esteve presente na minha vida, me aconselhando e ajudando para que eu alcançasse o sucesso. Minha vida não seria a mesma sem você. Você também é responsável pelo que sou hoje e por tudo que conquistei.

Aos meus familiares, pelo incentivo e carinho e por terem vibrado comigo a cada vitória.

Aos amigos, principalmente, Luísa Helena Perin de Melo pela cumplicidade, pelo companheirismo e por ter proporcionado a criação de uma amizade forte e verdadeira que estará para sempre comigo.

À República Cirandinha, pelos inúmeros momentos de diversão, alegria, aprendizado, companheirismo e pelos ensinamentos de convivência, respeito e irmandade, enfim, pela experiência única da vida republicana. Obrigada por poder contar com vocês sempre!

À vocês e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

RESUMO

Substâncias químicas presentes especificamente em plantas podem apresentar diferentes propriedades biológicas e serem utilizadas como princípios ativos no desenvolvimento de novos produtos. *Cymbopogon densiflorus* é utilizada popularmente no tratamento de várias enfermidades e estudos sobre o óleo essencial desta espécie revelaram os monoterpenos como sendo seus principais constituintes. Este trabalho teve o propósito de desenvolver nanoemulsões contendo o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, seguido do estudo da sazonalidade e avaliação de atividades biológicas. O óleo essencial foi obtido pela hidrodestilação das partes aéreas desta espécie e a sazonalidade foi analisada a cada dois meses por CG/EM. Os maiores rendimentos do óleo foram obtidos entre o período de novembro a março, havendo manutenção de mais de 90% da sua composição para todo o período analisado. As nanoemulsões foram preparadas através do método de inversão de fases, apresentando um aspecto branco leitoso e homogêneo. Amostras da formulação foram avaliadas quanto ao tamanho médio das partículas, obtendo valores em torno de 76 nm e índice de polidispersão inferior a 0,1. O valor médio do pH foi de 3,277 e um perfil de condutividade elétrica característico da inversão de fases foi observado. O potencial zeta foi próximo de -9 mV e o comportamento reológico evidenciou-se do tipo newtoniano. Além disso, a nanoemulsão demonstrou ser estável após submissão ao estresse térmico e centrifugação. A avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana foi realizada a partir do ensaio de difusão em disco, utilizando-se cepas das bactérias *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, além da levedura *Candida albicans* ATCC14408. Todos os microrganismos foram sensíveis ao óleo essencial e, posteriormente, essa propriedade foi quantificada pela técnica da microdiluição seriada. A atividade antioxidante foi avaliada por meio do método de sequestro de radicais livres e os valores da $CI_{50\%}$ da quantidade inicial de DPPH para o ácido gálico, óleo essencial e nanoemulsão foram equivalentes a $1,09 \times 10^{-3}$; 14,689 e 73,840 mg/mL, respectivamente. E, por fim, o potencial alelopático foi determinado através de bioensaios de germinação sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*), pepino (*Cucumis sativus*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*). O óleo puro e sua forma nanoemulsionada apresentaram valores efetivos

da $CI_{50\%}$ da germinação e do crescimento da raiz para todas as sementes. Desta forma, foi possível demonstrar a viabilidade de preparar nanoemulsões contendo o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e a capacidade destas em manter ou até mesmo aumentar o efetivo desempenho do óleo diante das propriedades antimicrobiana, antioxidante e alelopática.

Palavras-chaves: *Cymbopogon densiflorus*, nanoemulsão, sazonalidade, antimicrobiano, antioxidante, alelopatia.

ABSTRACT

Specific chemicals present in plants have different biological properties and are used as active principles in the new products development. *Cymbopogon densiflorus* is popularly used to diseases treatment and essential oil studies revealed the monoterpenes as the main constituents. This work aimed to develop *C. densiflorus* leaves essential oil based nanoemulsions, followed by the seasonal study and evaluation of biological activities. The essential oil was obtained by hydrodistillation from the aerial parts and seasonality was analyzed every two months by GC-MS. The highest oil yields were obtained between november and march and more than 90% of composition was maintained for the whole period. The nanoemulsions were prepared by phase inversion method with a opaque white and homogeneous appearance. Nanoemulsions particles size measurements were around 76 nm and polydispersivity index was less than 0,1. The pH average was 3,277 and typical phase inversion electrical conductivity profile was observed. The zeta potential was near -9 mV and rheological behavior is Newtonian type. Moreover, the nanoemulsion was stable after subjection to thermal stress and centrifugation. Antimicrobial activity qualitative evaluation was performed by disk diffusion assay with strains of the bacteria *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and the yeast *Candida albicans* ATCC14408. All microorganisms were sensitive for essential oil and subsequently this property was measured by serial microdilution technique. The antioxidant activity was evaluated by DPPH free radicals scavenging method and the DPPH half maximal inhibitory concentration (IC_{50%}) from gallic acid, essential oil and nanoemulsion were $1,09 \times 10^{-3}$, 14,689 and 73,840 mg/mL, respectively. Finally, the allelopathic potential was determined by germination bioassay to lettuce (*Lactuca sativa*) cucumber (*Cucumis sativus*) and tomato (*Lycopersicum esculentum*) seeds. The essential oil and nanoemulsion presented satisfactory germination and root growth IC_{50%} values for all seeds. Thus, it demonstrate the feasibility to preparing *C. densiflorus* leaves essential oil based nanoemulsions and their ability to maintain or even increase the effective oil performance for the antimicrobial, antioxidant and allelopathic properties.

Keywords: *Cymbopogon densiflorus*, nanoemulsion, seasonality, antimicrobial, antioxidant, allelopathy.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Plantas medicinais	6
2.2. <i>Cymbopogon densiflorus</i>	7
2.3. Metabolismo secundário	8
2.4. Óleos essenciais	9
2.5. Sazonalidade	11
2.6. Emulsões	13
2.7. Atividade antimicrobiana	17
2.8. Atividade antioxidante	19
2.9. Atividade alelopática	20
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Material botânico	25
4.2. Obtenção do óleo essencial e estudo da sazonalidade	25
4.3. Caracterização química dos óleos essenciais	27
4.4. Desenvolvimento da nanoemulsão	27
4.4.1. Obtenção da nanoemulsão	27
4.4.2. Caracterização da nanoemulsão	29

4.4.2.1. <i>Análise macroscópica</i>	29
4.4.2.2. <i>Análise microscópica</i>	29
4.4.2.3. <i>Determinação do valor de pH</i>	29
4.4.2.4. <i>Determinação da condutividade elétrica</i>	29
4.4.2.5. <i>Determinação do tamanho de partícula</i>	29
4.4.2.6. <i>Determinação do potencial zeta</i>	30
4.4.2.7. <i>Determinação do comportamento reológico</i>	30
4.4.2.8. <i>Ensaio de estabilidade acelerada</i>	30
a) <i>Estresse térmico</i>	30
b) <i>Centrifugação</i>	31
4.5. <i>Atividade antimicrobiana</i>	31
4.5.1. <i>Atividade antimicrobiana qualitativa</i>	31
4.5.2. <i>Atividade antimicrobiana quantitativa</i>	33
4.6. <i>Atividade antioxidante</i>	34
4.7. <i>Atividade alelopática</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. <i>Obtenção do óleo essencial e estudo da sazonalidade</i>	39
5.2. <i>Caracterização química dos óleos essenciais</i>	40
5.3. <i>Desenvolvimento da nanoemulsão</i>	50
5.3.1. <i>Obtenção da nanoemulsão</i>	50
5.3.2. <i>Caracterização da nanoemulsão</i>	50
5.3.2.1. <i>Análise macroscópica</i>	50
5.3.2.2. <i>Análise microscópica</i>	51
5.3.2.3. <i>Determinação do valor de pH</i>	51
5.3.2.4. <i>Determinação da condutividade elétrica</i>	52

5.3.2.5. <i>Determinação do tamanho de partícula</i>	53
5.3.2.6. <i>Determinação do potencial zeta</i>	54
5.3.2.7. <i>Determinação do comportamento reológico</i>	56
5.3.2.8. <i>Ensaio de estabilidade acelerada</i>	57
a) <i>Estresse térmico</i>	57
b) <i>Centrifugação</i>	59
5.4. <i>Atividade antimicrobiana</i>	60
5.4.1. <i>Atividade antimicrobiana qualitativa</i>	60
5.4.2. <i>Atividade antimicrobiana quantitativa</i>	62
5.5. <i>Atividade antioxidante</i>	65
5.6. <i>Atividade alelopática</i>	67
6. <i>CONCLUSÃO</i>	74
7. <i>REFERÊNCIAS</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

A/O - Água em óleo

ATCC - *American Type Culture Collection*

atm - Atmosfera

°C - Grau Celsius

CG/MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

CI_{50%} - Concentração Inibitória de 50%

CIM - Concentração Inibitória Mínima

cm - Centímetro

cm/s - Centímetro/segundo

cP - CentiPoise

DEBIO - Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente

DMAP - Pirofosfato de dimetilalila

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EHL - Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

EPI - *Emulsion Phase Inversion*

ERO - Espécie reativa de oxigênio

ICEB - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

IK - Índice de Kovats

IP - Índice de Polidispersão

IPP - Pirofosfato de isopentenila

LPS - Lipopolissacarídeos

MEP - Metileritritol fosfato

µg/mL - Micrograma/mililitro

µL - Microlitro

µL/mL - Microlitro/mililitro

µm - Micrômetro

$\mu\text{s/cm}$ - MicroSiemens/centímetro
m - Metro
mg - Miligrama
mg/mL - Miligrama/mililitro
min - Minuto
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MRSA - *Staphylococcus aureus* metilina resistente
mV - Milivolts
m/v - Massa/volume
MVA - Ácido mevalónico
NaCl - Cloreto de Sódio
nL/mL - Nanolitro/mililitro
nm - Nanômetro
O/A - Óleo em água
pH - Potencial Hidrogeniônico
PIT - *Phase Inversion Temperature*
ppm - Partes por milhão
 R^2 - Coeficiente de correlação linear
rpm - Rotação por minuto
TR - Tempo de retenção
UFC/mL - Unidade formadora de colônia/mililitro
UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto
USFDA - *United States Food and Drug Administration*
USP - Universidade de São Paulo
UVB - Ultravioleta B
 ZnCl_2 - Cloreto de Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de unidades de isopreno a partir do ácido mevalônico (MVA) e biossíntese de terpenóides a partir da ligação "cabeça-cauda" das unidades de isoprenos. (Fonte: Romminger, 2013, com modificações)	10
Figura 2: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta. (Fonte: Gobbo-Neto & Lopes, 2007)	12
Figura 3: Representação dos glóbulos de emulsões do tipo O/A e A/O. (Fonte: Oliveira <i>et al.</i> , 2004, com modificações)	13
Figura 4: Exemplares da espécie <i>Cymbopogon densiflorus</i>	25
Figura 5: Processo de obtenção do óleo essencial a partir da hidrodestilação.	26
Figura 6: Estabilização do radical livre DPPH. (Fonte: Rufino <i>et al.</i> , 2007)	36
Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais constituintes monoterpênicos presentes no óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> . a) <i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol. b) <i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol. c) <i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol. d) <i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol. e) <i>cis</i> -piperitol.	47
Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas referente a caracterização dos óleos essenciais de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas durante o estudo da sazonalidade.	49
Figura 9: Nanoemulsão obtida a partir do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	50
Figura 10: Fotomicroscopia da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	51
Figura 11: Perfil da condutividade elétrica de acordo com a temperatura para uma replicata da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> . ..	52
Figura 12: Representação gráfica da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	54
Figura 13: Representação gráfica do potencial zeta da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	55
Figura 14: Representação gráfica do comportamento reológico da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	56

Figura 15: Halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> sobre os microrganismos a) <i>Escherichia coli</i> ATCC25922, b) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 e d) <i>Candida albicans</i> ATCC14408.....	60
Figura 16: Tamanho dos halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> sobre os microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 e <i>Candida albicans</i> ATCC14408.*Não apresentou formação do halo de inibição, 6 mm refere-se ao tamanho do disco utilizado no teste.	61
Figura 17: Demonstração ilustrativa do crescimento bacteriano nos controles e amostras para determinação da concentração inibitória mínima.	63
Figura 18: Avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> , nanoemulsão com óleo essencial e controle da nanoemulsão.	65
Figura 19: Avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido gálico e óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	65
Figura 20: Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial puro de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e sua concentração na forma nanoemulsionada.	66
Figura 21: Avaliação da atividade antioxidante da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e de seu controle sem o óleo essencial.	66
Figura 22: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.....	68
Figura 23: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.....	69
Figura 24: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituição da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	28
Tabela 2: Constituição do controle da nanoemulsão sem óleo essencial.	28
Tabela 3: Preparo das concentrações para a curva do padrão ácido gálico.	34
Tabela 4: Preparo das concentrações para as curvas de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> , nanoemulsão com óleo essencial e controle da nanoemulsão.	35
Tabela 5: Rendimento do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> de acordo com a coleta.	39
Tabela 6: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em maio de 2013 (1).	40
Tabela 7: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em julho de 2013 (2).	42
Tabela 8: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em setembro de 2013 (3).	43
Tabela 9: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em novembro de 2013 (4).	44
Tabela 10: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em janeiro de 2014 (5).	45
Tabela 11: Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> coletadas em março de 2014 (6).	46
Tabela 12: Concentração relativa (%) dos constituintes identificados no óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> para seis coletas diferentes.	48
Tabela 13: Valores das replicatas da determinação do pH da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	51
Tabela 14: Valores das replicatas da determinação da condutividade elétrica e do ponto de inversão de fases da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	52
Tabela 15: Valores das replicatas da determinação do tamanho da partícula da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	53

Tabela 16: Valores das replicatas do potencial zeta da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	54
Tabela 17: Parâmetros do comportamento reológico da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> de acordo com o período analisado....	56
Tabela 18: Valores da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> após a submissão ao estresse térmico de acordo com o período analisado.	58
Tabela 19: Valores da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> após a submissão a centrifugação de acordo com o período analisado.	59
Tabela 20: Tamanho dos halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> sobre os microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 e <i>Candida albicans</i> ATCC14408.....	60
Tabela 21: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e da nanoemulsão com óleo essencial sobre os microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 e <i>Candida albicans</i> ATCC14408.....	62
Tabela 22: Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da atividade antioxidante para o padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e nanoemulsão com óleo essencial..	66
Tabela 23: Determinação da CI _{50%} da atividade antioxidante para o padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e nanoemulsão com óleo essencial.	67
Tabela 24: Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da porcentagem de inibição da germinação e porcentagem de inibição do crescimento da raiz para o óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e nanoemulsão com óleo essencial sobre sementes de alface, pepino e tomate.....	70
Tabela 25: Determinação da CI _{50%} da germinação e do crescimento da raiz para o óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e nanoemulsão com óleo essencial sobre sementes de alface, pepino e tomate.....	70

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A existência de diferentes biomas distribuídos no território brasileiro garante ao país uma enorme gama de espécies vegetais. O uso de plantas e derivados como objeto medicamentoso acompanhou o processo civilizatório e ainda representa uma fonte de recursos à moderna farmacologia (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005; Maciel *et al.*, 2002).

Pesquisas recentes têm sido direcionadas na procura de substâncias de origem vegetal que possuam maiores propriedades farmacológicas das encontradas nos produtos químicos. Preferencialmente, essas substâncias devem apresentar um custo reduzido para sua obtenção e um baixo teor de toxicidade, problemas estes encontrados nos produtos disponíveis no mercado atual (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005; Maciel *et al.*, 2002).

Pertencente à família Poaceae, o gênero *Cymbopogon* é originário da África e Ásia e compreende espécies distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical do planeta. No Brasil, muitas espécies deste gênero foram introduzidas e se adaptaram. Dentre elas, pode-se destacar o *C. densiflorus*, conhecido popularmente como “capim-cablocó” ou “capim-santo” e utilizado popularmente para o tratamento de algumas doenças como asma, febre, epilepsia e dores abdominais, assim como, na culinária e na produção de perfumes (Takaisi-Kikuni, Tshilanda & Babady, 2000; Soenarko, 1977).

Além da preocupação com a procura por alternativas diferenciadas da terapêutica convencional, também se faz necessário um maior esforço sobre a padronização dos dados científicos obtidos com o uso delas. Isso se deve ao fato de que podem existir inúmeras diferenças de acordo com o ambiente onde a planta se desenvolve, as partes da planta utilizadas, forma do cultivo e época da colheita, bem como, com a obtenção e conservação das substâncias obtidas através das espécies vegetais (Garcia & Lunardi, 2001).

Diante desses relatos, estudos da sazonalidade são salientados quanto seus valores e necessidades por permitir uma prospecção mais efetiva sobre as plantas, possibilitando, com isso, um aumento no controle de qualidade de produtos originados a partir de matérias-primas vegetais (Gobbo-Neto & Lopes, 2007, Borella *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário, apresentando uma composição química complexa. A presença desses compostos garante a sua capacidade de apresentar significativas atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante e alelopática. No entanto, esses óleos quando extraídos, caracterizam-se por serem líquidos oleosos, geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, voláteis e instáveis na presença de ar, luz, calor e umidade. (Simões *et al.*, 2010; Potzernheim *et al.*, 2006)

Ao considerar a resistência dos patógenos frente aos antimicrobianos utilizados atualmente, pode-se considerar que a procura por novos compostos de origem natural que detenham essa atividade de forma eficaz mostra-se de significância relevante tanto acadêmica quanto econômica (Ganjewala, 2009; Lima *et al.*, 2006).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais tem origem endógena ou são provenientes de outras fontes. Lesões de caráter cumulativo podem ocorrer diante de uma limitação na disponibilidade de antioxidantes e, por conseguinte, na incapacidade de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (Sousa *et al.*, 2007).

Alelopatia é o efeito, estimulatório ou inibitório, de constituintes químicos liberados de uma planta sobre a outra. Estes, por sua vez, têm sido utilizados no controle de doenças na produção agrícola, acarretando benefícios como a menor utilização de produtos químicos industrializados, redução de resíduos tóxicos contaminantes, além de serem eficazes na prevenção e na cura dessas doenças (Souza Filho, 2002; Araújo Filho, 2000).

Sendo assim, as diversas propriedades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais, além de benéficas características como origem natural, biodegradabilidade, baixa toxicidade e atuação sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, tornam-os alvo para pesquisa de novos medicamentos. Porém, as características físico-químicas dos óleos dificultam a sua manipulação e podem, durante o preparo de formulações, sofrer danos que alterem suas atividades (Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012).

Posto isto, as nanoemulsões óleo-água (O/A) são formas farmacêuticas aconselháveis e representam uma alternativa para utilização deste componente oleoso ao contornar suas particularidades e permitir a veiculação de moléculas de

hidrossolubilidade reduzida. Além disto, apresentam um número adicional de vantagens em comparação aos sistemas convencionais relacionadas ao seu pequeno diâmetro de gotícula, como metaestabilidade, necessidade de baixas concentrações de tensoativos e diluição sem perda da sua estrutura inicial (Bernardi, 2011; Pianovski *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2006; Haskell *et al.*, 1998; Muller, Benita & Bohm, 1998).

Neste contexto, levando-se em consideração as atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, bem como as potencialidades da sua formulação, a presente dissertação visa desenvolver nanoemulsões contendo o óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Plantas medicinais

"Planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (WHO, 2003)."

As plantas medicinais são de extrema importância para o tratamento, cura e prevenção de diversas enfermidades ao representarem a única opção terapêutica para algumas comunidades e grupos étnicos (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005; Maciel *et al.*, 2002). Realidade esta que pôde ser observada a partir de um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em que foi relatado que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam dessa tradição como forma de assegurar os cuidados básicos de saúde (Ministério da Saúde, 2006).

É notória a grande procura no desenvolvimento de novos produtos com propriedades terapêuticas a partir do uso de plantas, sendo necessário cada vez mais estudos químicos e farmacológicos que comprovem suas atividades (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005; Maciel *et al.*, 2002). Outro aspecto importante é a utilização de princípios ativos naturais como modelo para a síntese de substâncias análogas, mais potentes e seletivas, que possam ser obtidas mais facilmente e até mesmo a custos menores. Sendo assim, as plantas medicinais, a partir de seu uso na medicina popular, têm contribuído para a obtenção de fármacos utilizados na terapêutica clínica (Maciel *et al.*, 2002; WHO, 1998).

O Brasil é o país detentor da maior biodiversidade do planeta, assim como, de uma diversidade étnica e cultural que proporciona conhecimentos do uso tradicional de plantas medicinais e o torna referência para o desenvolvimento de pesquisas associando-as a tecnologias e terapêuticas apropriadas (Ministério da Saúde, 2006; Simões & Schenkel, 2002). Apesar da existência dessa potencialidade, das cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas apenas 8% apresentam estudos quanto à presença de compostos bioativos e 1.100 espécies têm suas propriedades medicinais estudadas (Guerra & Nodari, 2001; Prance, 1977). Com isso, acredita-se que o reino vegetal é uma fonte promissora para geração de novos conhecimentos a fim de se

descobrir novas moléculas bioativas com aplicações na tecnologia farmacêutica, assim como, para o desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação.

2.2. *Cymbopogon densiflorus*

A espécie *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf. pertence à família Poaceae, a qual consiste em cerca de 700 gêneros e 12.000 espécies, sendo, dentre as famílias de Angiosperma, a de maior relevância para a economia humana (Watson & Dallwitz, 1992; Soenarko, 1977).

Cymbopogon, do grego *kumbe* (navio) e *pogon* (barba), referindo-se ao formato das inflorescências, constitui-se de espécies perenes ou raramente anuais, cespitosas, aromáticas, tolerantes ao estresse, bem como adaptadas às diversas condições climáticas e edáficas. Este gênero é originário de regiões subtropical e tropical da África, Ásia e Austrália e compreende cerca de 180 espécies, sendo conhecido pela importância da utilização de seus óleos essenciais na culinária, na produção de perfumes, cosméticos, saneantes domissanitários e produtos farmacêuticos (Akhila, 2010; Khanuja *et al.*, 2005; Soenarko, 1977).

Conhecida popularmente como “capim-limão”, “capim-cablocó” ou “capim-santo”, a espécie *C. densiflorus* foi introduzida e naturalizada no Brasil no período colonial, apresentando folhas com característico cheiro de limão, lâminas foliares planas e glabras, seu colmo ereto mede em torno de 70 a 200 cm e pendulado devido à densa inflorescência (Barbosa, 2007; Watson & Dallwitz, 1992; Soenarko, 1977).

Popularmente, esta espécie é utilizada como um estimulante e estíptico pelos africanos. Além de existir relatos de seu uso na medicina tradicional contra diversas doenças como asma, febre, resfriado, epilepsia, câimbras, cólicas, dores abdominais, tosse, bronquite, rouquidão e afecções catarrais (Akhila, 2010; Takaisi-Kikuni *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1995; Soenarko, 1977).

Pesquisas do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *C. densiflorus*, a partir do método de macrodiluição, mostraram que o mesmo apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Takaisi-Kikuni, Tshilanda & Babady, 2000).

Os óleos essenciais obtidos a partir de espécies do gênero *Cymbopogon* compreendem, principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos (Akhila, 2010). Dentre

os constituintes encontrados no óleo essencial de folhas e flores de *C. densiflorus*, já foram identificados compostos como limoneno, cineol, diosfenol, ocimeno, diidrotagetona, cimeneno, *p*-cimeno, *cis* e *trans*-carveol, carvona, *iso*-piperitenona, *cis*-*p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *p*-menta-1,3,8-trieno, epóxido *cis* e *trans*-limoneno, 3,9-epóxido-*p*-menta-1,8-dieno, 1,2-epóxido-*p*-ment-8-eno, *cis* e *trans*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, *cis* e *trans*-diidrocarvona, álcool perfílico, verbenol e hexanoato de 2-feniletil (Takaisi-Kikuni, Tshilanda & Babady, 2000; Chisowa, 1997; Heiba & Rizk, 1986).

Estudos recentes têm revelado muitas atividades biológicas úteis dos óleos essenciais, tais como: anti-inflamatória, anticancerígena, anti-helmíntica, antioxidante, alelopática e repelentes de insetos (Ganjewala, 2009; Das & Ansari, 2003; Heiba & Rizk, 1986). Sendo assim, características como a fácil disponibilidade, propriedades olfativas agradáveis e toxicidade insignificante dos óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*, tornam-as candidatas promissoras para o tratamento de doenças, assim como, uma alternativa aos pesticidas químicos sintéticos (Ganjewala, 2009).

2.3. Metabolismo secundário

A terminologia em que o metabolismo das plantas encontra-se dividido em primário e secundário sugere, frequentemente de forma errônea, que estes sejam os responsáveis pela produção de substâncias essenciais e não essenciais, respectivamente (Vizzoto, Krolow & Weber, 2010). Neste contexto, as funções básicas vitais, como por exemplo, crescimento, desenvolvimento e reprodução se enquadram no metabolismo primário, tendo caráter conservativo e universal. Por outro lado, funções importantes na autodefesa e adaptação das plantas no ambiente, contribuindo para uma melhor interação com os diferentes ecossistemas, estão associadas ao metabolismo secundário. No entanto, estes metabólitos não apresentam uma distribuição que pode ser encontrada em todas as plantas, devendo considerar, então, que certos componentes estarão presentes somente em determinadas espécies, o que demonstra sua importância também na taxonomia (Fumagali *et al.*, 2008; Cseke, *et al.*, 2006; Bourgaud *et al.*, 2001).

As substâncias formadas a partir do metabolismo secundário das plantas podem ser classificadas em três diferentes grupos de acordo com a rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Fumagali *et al.*, 2008). Os terpenos são formados a partir da justaposição sequencial da substância isopentenilpirofosfato, sendo

responsáveis por diversas funções como alelopática, inseticida, atração de polinizadores e hormonais. Já os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura no mínimo um anel aromático ligado a pelo menos uma hidroxila e estão envolvidos principalmente na sinalização entre plantas e outros organismos e na proteção contra os raios ultravioleta. E por fim, os alcaloides possuem uma estrutura cíclica com ao menos um nitrogênio ligado ao anel e são conhecidos principalmente pelos seus acentuados efeitos sob o sistema nervoso (Vizzoto, Krolow & Weber, 2010).

Sendo assim, os metabólitos secundários possuem atividades antibióticas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias para proteção das plantas contra patógenos, bem como, atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas. Além disso, são fontes de substâncias ativas farmacologicamente. Diante das extensas ações biológicas, os metabólitos secundários provenientes das plantas têm se tornado interessante no cenário acadêmico, bem como, para a produção de cosméticos, medicamentos, alimentos e agroquímicos (Vizzoto, Krolow & Weber, 2010; Fumagali *et al.*, 2008; Cseke, *et al.*, 2006; Bourgaud *et al.*, 2001).

2.4. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de terpenóides cíclicos e acíclicos, podendo apresentar diversas funções orgânicas. Os terpenos provenientes das plantas são biossintetizados a partir do ácido mevalônico (MVA) ou do metileritritol fosfato (MEP), os quais dão origem a duas unidades importantes, pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAP), que são os precursores imediatos dos terpenos. As moléculas de IPP e DMAP contêm cinco carbonos (5C) cada e a formação de unidades maiores geralmente ocorre a partir da união destas através do modelo "cabeça-cauda" (Figura 1). Sendo assim, os terpenos são facilmente classificados, de acordo com o número de unidades de isopreno (5C), em: hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) e politerpenos (unidades maiores) (Castro *et al.*, 2010; Cseke, *et al.*, 2006; Croteau, Kutchan & Lewis, 2000).

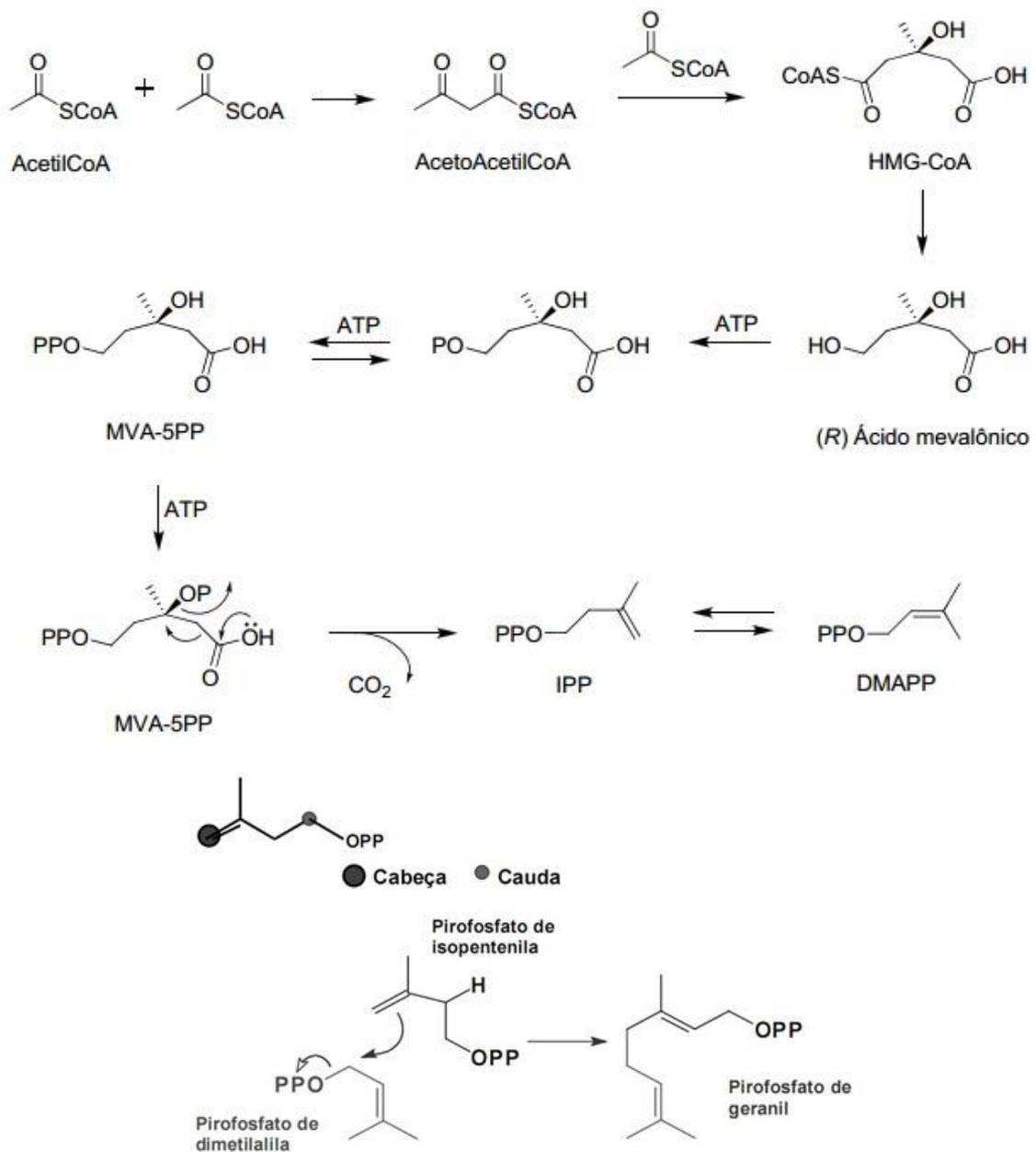


Figura 1: Formação de unidades de isopreno a partir do ácido mevalônico (MVA) e biossíntese de terpenóides a partir da ligação "cabeça-cauda" das unidades de isoprenos. (Fonte: Romminger, 2013, com modificações)

Monoterpenos são substâncias incolores, lipofílicas e voláteis responsáveis pelos odores característicos de óleos essenciais e aromas de muitas plantas (Castro *et al.*, 2010; Ganjewala, 2009). A função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atrair polinizadores quanto para repelir insetos e estão envolvidos na sua defesa contra pragas e doenças (Vizzoto, Krolow & Weber, 2010).

Estes óleos, amplamente utilizados como fragrâncias e sabores nas indústrias de perfumaria e alimentos, vêm ganhando papel de destaque ao apresentar ações inseticida e fungicida contra pragas e patógenos de espécies vegetais importantes, revelando serem ativas contra um largo espectro de pragas, toxicidade interespecífica e compostos altamente idiossincráticos (Isman, 2000). Além disso, outros estudos demonstram inibir efetivamente a germinação de plantas, sugerindo seu uso potencial como bio-herbicidas (Dudai *et al.*, 1999).

Com isso, além de apresentar diversas ações biológicas, grande parte dos monoterpenos revelam baixa toxicidade para os mamíferos, sendo considerados como seguros pela *United States Food and Drug Administration* (USFDA) (Chagas *et al.*, 2002).

A nível mundial, estima-se a existência de 300 óleos essenciais de importância comercial, dentre os principais, pode-se citar a citronela obtida a partir das espécies *Cymbopogon winterianus* Jowitt e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. O Brasil, juntamente com a Índia, China e Indonésia são considerados os maiores produtores de óleos essenciais, porém, nosso país permanece estagnado devido a dificuldades como ausência da manutenção do padrão de qualidade dos óleos, falta de representatividade nacional e investimentos governamentais ínfimos no setor. Diante desta realidade, é de suma importância o vínculo entre os produtores e os centros de pesquisas na agregação de valores científicos e financeiros ao produto (Bizzo, Hovell & Rezende, 2009).

2.5. Sazonalidade

O metabolismo vegetal pode ser alterado devido a variações no tempo e espaço, e conseqüentemente, modificar as proporções relativas de seus metabólitos secundários. Além disso, a relação de procedimentos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos pode influenciar na alternância da expressão gênica, mesmo que haja um preceito que a defina. Dentre os principais fatores responsáveis por essa mudança, podem-se evidenciar os aspectos físico-químicos como os diferentes níveis sazonais e diários, temperatura, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica e nutricional. Além disso, há a existência de elementos bióticos como ataque de patógenos, espécie, idade e desenvolvimento da planta, bem como os diferentes órgãos vegetais (Figura 2). E por fim, os distintos

critérios relacionados à obtenção do produto como as condições de coleta, estabilização e estocagem (Castro *et al.*, 2010; Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Borella *et al.*, 2006; Bulbovas *et al.*, 2005; Marques & Oliveira, 2004; König *et al.*, 2002).

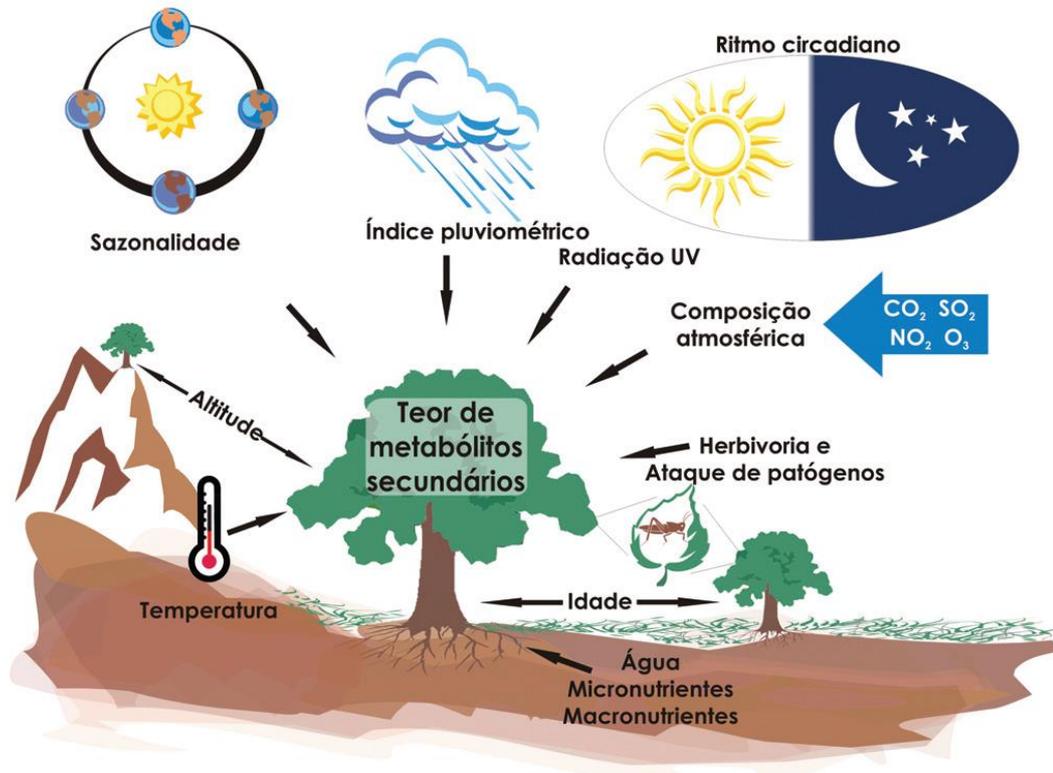


Figura 2: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.
(Fonte: Gobbo-Neto & Lopes, 2007)

Em suma, a produção dos metabólitos secundários é uma resultante química da interação das plantas e o ambiente onde ocorre. Estudos que relatam a alternância dessas substâncias de acordo com uma variável específica são de grande relevância para o melhor conhecimento do funcionamento biológico vegetal, no entanto, deve ser ressaltada a existência de fatores que atuam interagindo entre si e não isoladamente, sendo assim, o conjunto seria capaz de influenciar a taxa biossintética de metabólitos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007, Borella *et al.*, 2006; Bulbovas *et al.*, 2005; König *et al.*, 2002).

Sazonalidade refere-se à periodicidade, ou seja, eventos característicos de uma época ou estação do ano. Presumivelmente, a variação sazonal climática é a mais influente entre as distintas causas que condicionam os padrões fenológicos das espécies vegetais (Marques & Oliveira, 2004).

As principais classes de metabólitos secundários, como os óleos essenciais, flavonoides e alcaloides são influenciados pelas variações sazonais. Assim sendo, a padronização para a época da coleta de uma planta é fundamental para obter maior teor de óleo essencial e melhor qualidade, visto que sua constituição química a nível quantitativo e qualitativo pode variar no decorrer do ano. (Castro *et al.*, 2010; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

2.6. Emulsões

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e heterogêneos, compostos por dois líquidos imiscíveis, sendo um deles completamente disperso na forma de glóbulos (fase interna, descontínua ou dispersa) em outro líquido (fase externa, contínua ou dispersante) e estabilizados pela presença de um ou a combinação de agentes emulsificantes. Desse modo, as emulsões são constituídas por três fases: fase oleosa, fase aquosa e tensoativos. As emulsões simples podem ser classificadas em dois tipos: óleo em água (O/A), na qual as gotículas da fase oleosa estão dispersas na fase contínua aquosa e água em óleo (A/O), na qual as gotículas da fase aquosa estão dispersas na fase contínua oleosa (Figura 3) (Bernardi, 2011; Mason *et al.*, 2006; Chen & Tao, 2005; Araujo *et al.*, 2001; Becher, 2001).

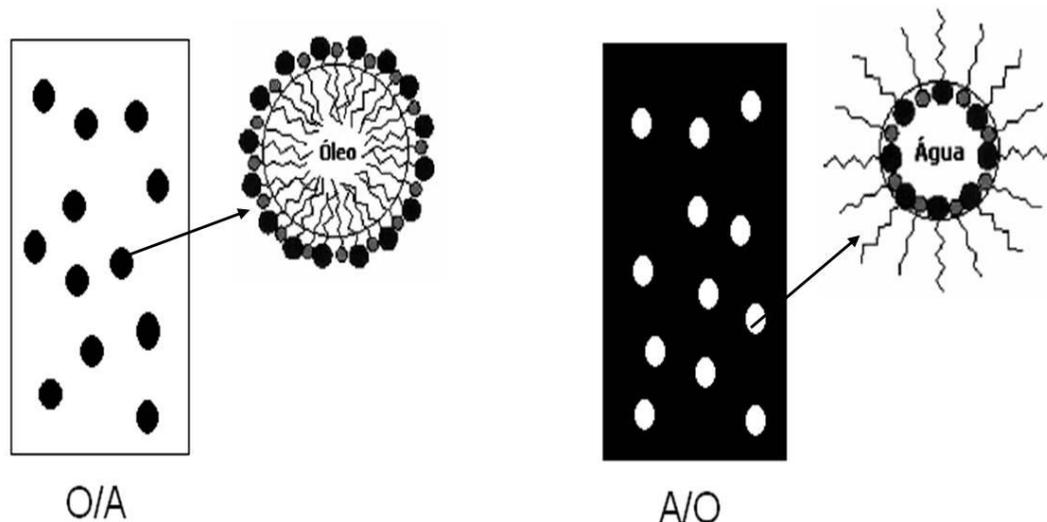


Figura 3: Representação dos glóbulos de emulsões do tipo O/A e A/O. (Fonte: Oliveira *et al.*, 2004, com modificações)

Moléculas com características anfifílicas, os tensoativos se localizam na interface entre a fase dispersa e a fase dispersante e são responsáveis pela estabilização cinética das dispersões coloidais, por meio da redução da tensão interfacial do sistema e formação de um filme, ao redor dos glóbulos da fase dispersa, com propriedades estéricas e eletrostáticas. A solubilidade deste constituinte define o tipo da formulação a ser formada, isto é, quando o surfactante é essencialmente solúvel em uma fase, esta tende a ser a fase contínua e a outra, a dispersa. Dessa forma, ao utilizar um tensoativo preferencialmente solúvel em água, a emulsão obtida será do tipo O/A, caso contrário, uma emulsão do tipo A/O será formada por meio de um tensoativo mais solúvel em óleo. Ao analisar a relação hidrofílica-lipofílica de cada molécula de surfactante, define-se maior solubilidade em óleo e água para valores de EHL (Equilíbrio hidrófilo-lipófilo) próximos de zero e 40, respectivamente. Assim sendo, ao almejar a produção de emulsões estáveis, deve-se selecionar um emulsionante ou a combinação destes com valores próximos de EHL requerido pela fase oleosa (Mason *et al.*, 2006; Pays, 2002).

No entanto, diferentes fenômenos podem influenciar na estabilidade das emulsões. A cremação ocorre devido às diferenças na densidade entre as duas fases, em que a influência da gravidade causa separação das fases. A floculação é descrita como a agregação das partículas devido à baixa força entre os coloides e depende da energia de interação entre duas partículas em função da distância, neste caso, a atração depende das forças de Van der Waals e a repulsão do tensoativo presente na interface. A coalescência é resultado da fusão dos glóbulos e muitas vezes é considerada a mais importante para os sistemas dispersos, visto que pode acarretar na inversão de fases. E o *Ostwald ripening*, fenômeno de maior ocorrência, é um processo no qual o glóbulo de maior tamanho cresce em detrimento dos menores, devido ao aumento da solubilidade de glóbulos menores oleosos da fase dispersa na fase contínua. Desse modo, estes glóbulos de tamanho reduzido tendem a se dissolver, difundem-se através do seu material e se depositam em uma gota maior, provocando aumento da granulometria do sistema (Bernardi, 2011; Mason *et al.*, 2006; Chen & Tao, 2005; Araujo *et al.*, 2001; Becher, 2001)

As dispersões em que o tamanho das gotículas dispersas estão em escala nanométrica, compreendendo um tamanho na faixa entre 50 a 500 nm, estabilizadas por um associado tensoativo adequado, são denominadas nanoemulsões (Forgiarini *et al.*,

2001). Uma maior estabilidade é propiciada pelo tamanho reduzido de suas partículas, uma vez que o movimento Browniano dos glóbulos ou a taxa de difusão influencia positivamente, dificultando os processos de sedimentação e cremação induzidos pela força gravitacional. Este sistema, geralmente, possui uma distribuição unimodal e revela-se como um modelo alternativo para administração de moléculas de reduzida hidrossolubilidade (Bernardi, 2011; Kourniatis, Spinelli & Mansur, 2010; Fraga, 2007; Mason *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Martini, 2005; Bouchemal *et al.*, 2004).

As técnicas para obtenção de nanoemulsões podem ser divididas em dois grupos: (1) métodos de alta e (2) método de baixa energia de emulsificação (emulsificação por inversão de fases e emulsificação da temperatura de inversão de fases). No primeiro caso, as nanoemulsões são formadas por procedimentos onde há doação de energia, geralmente, de dispositivos mecânicos ou do potencial químico dos componentes. Nos processos mecânicos, se faz necessário a doação de uma alta energia para promover uma taxa de cisalhamento capaz de deformar a partícula, a qual é alcançada, geralmente, pela utilização de homogeneizadores de alta pressão, microfluizadores ou geradores de ultrassom. Inicialmente as fases aquosa e oleosa são aquecidas separadamente e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade, o que define a emulsificação clássica, seguida da redução do diâmetro médio das partículas suspensas através de métodos físicos (Fraga, 2007; Silva *et al.*, 2006; Bouchemal *et al.*, 2004; Fronza, Campos & Teixeira, 2004; Tadros *et al.*, 2004; Abismail *et al.*, 1999; Benita, 1999).

Por outro lado, os métodos de baixa energia ocorrem a partir da inversão espontânea na curvatura do tensoativo para promover a formação de pequenos glóbulos. Este fenômeno pode ser alcançado pela mudança da temperatura do sistema que provoca uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas, a partir da utilização de tensoativos não iônicos. A passagem por um ponto de curvatura zero e tensão interfacial mínima durante o processo de resfriamento predispõe a formação de gotículas finamente dispersas. No entanto, essa transição pode ser complexa quando a inversão é atribuída ao aumento da fração volumétrica (*Emulsion Phase Inversion* - EPI) ou transicional. Para reverter a situação, Shinoda (1968) introduziu o método da temperatura de inversão de fases (*Phase Inversion Temperature* - PIT), correlacionando o método de inversão transicional e a

capacidade particular das emulsões estabilizadas por tensoativos não iônicos de sofrer uma inversão de fases de acordo com a variação de temperatura (Fraga, 2007; Silva *et al.*, 2006; Bouchemal *et al.*, 2004; Fronza, Campos & Teixeira, 2004; Tadros *et al.*, 2004; Abismail *et al.*, 1999; Benita, 1999).

Outras metodologias utilizadas em menores proporções também podem ser aplicadas, como por exemplo, a emulsificação espontânea, a qual ocorre quando a fase oleosa, dissolvida em um solvente orgânico, é vertida sobre a fase aquosa mediante agitação moderada e, posteriormente, através da destilação à pressão reduzida, o solvente orgânico é eliminado. Assim como, a incorporação de fármacos a nanoemulsões disponíveis comercialmente que define a preparação extemporânea (Fronza, Campos & Teixeira, 2004; Tadros *et al.*, 2004; Abismail *et al.*, 1999).

Como demonstrado anteriormente, o uso dos óleos essenciais para fins medicinais já é bastante conhecido. No entanto, sua aplicação de forma pura, seja para ingestão ou uso externo, pode provocar problemas como intoxicação e irritação da pele, além disso, caracterizam-se por serem voláteis. Dessa forma, a utilização de óleos carreadores, conhecidos como óleos vegetais ou fixos, se faz necessária para veicular e diluir essas essências, bem como, outros fármacos lipofílicos que venham a ser utilizados na preparação das nanoemulsões, além de poderem atuar como o próprio princípio ativo.

A nanobiotecnologia atua em diversas áreas do conhecimento e o grande interesse no estudo e desenvolvimento das nanoemulsões é demonstrado com numerosas publicações e patentes. Este sistema de liberação tem sido estudado e produtos para liberação parenteral, oral, ocular, pulmonar e dérmica de fármacos e outros ativos foram desenvolvidos e demonstram uma redução dos efeitos colaterais e promoção de efeitos farmacológicos prolongados dos mesmos quando nanoemulsionados. Dentre os sistemas vetorizados, as nanoemulsões são consideradas um dos mais atrativos para aplicação tópica, uma vez que apresentam glóbulos com tamanho na escala nanométrica, o que possibilita maior contato com a superfície da região aplicada. Pesquisas no desenvolvimento de nanoemulsões como carreadores ou sistemas de liberação controlada para compostos lipofílicos, como: fármacos, aromatizantes e agentes antimicrobianos, relacionam o aumento da biodisponibilidade desses constituintes encapsulados às dimensões reduzidas das partículas e à alta razão

de superfície para volume, o que proporciona uma maior penetração e uma absorção mais eficaz de ativos por esta via (Carneiro, 2013; Bernardi, 2011; Tadros *et al.*, 2004).

No setor cosmético, em virtude da crescente busca de uma melhor estética e dos cuidados com a pele, são apresentados diversos produtos nanoemulsionados para diferentes finalidades como: hidratantes, protetor solar, liberação de ativos antirrugas e proteção de ativos contra degradação. A grande aplicabilidade das nanoemulsões, também tem sido demonstrado na utilização como produtos para fins veterinário, inseticidas, agroquímicos e domissanitários (Bernardi, 2011; Tadros *et al.*, 2004).

As nanoemulsões apresentam aspecto transparente e/ou translúcido devido ao tamanho reduzido do glóbulo e sua aparência, textura e sensorial, tornam-as atraentes para o produto e, conseqüentemente, para o consumidor. A baixa granulometria do sistema também previne processos de instabilidade como cremação, sedimentação, floculação e coalescência. Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo, além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e fáceis de produzir. Essas características, bem como, a ausência de espessantes, redução na quantidade de tensoativos e possibilidade de serem diluídas com água sem perda de sua estrutura original são vantagens apresentadas por esse sistema e tornam-o preferência para veicular fármacos lipofílicos quando comparado a outros modelos de liberação de substâncias (Fraga, 2007; Mason *et al.*, 2006; Forgiarini *et al.*, 2001). Por conseguinte, as nanoemulsões vêm sendo bastante estudadas e já possuem aplicações práticas em diversas áreas, como química, farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola, denotando como promissores carreadores de fármacos ou ativos para muitas aplicações (Bernardi, 2011).

2.7. Atividade antimicrobiana

A quimioterapia antimicrobiana teve seu desenvolvimento iniciado a partir da década de 30 com a descoberta das sulfonamidas e as penicilinas. No entanto, nas décadas subsequentes de 50 e 70, foram relatadas epidemias por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. A multiresistência é, hoje, um grande problema de saúde pública, o que pode ser observado com o surgimento de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), principal patógeno nosocomial no âmbito hospitalar e responsável por inativar

a ação de vários antibióticos (Silva *et al.*, 2007). Outro agravante do uso indiscriminado dos antibióticos foi a incorporação de agentes antimicrobianos na ração de aves e suínos com o intuito de promover o crescimento destes animais ao reduzirem a morbidade e a mortalidade causadas por doenças clínicas e subclínicas (Santurio *et al.*, 2007).

Portanto, o rápido desenvolvimento de resistência dos microrganismos patogênicos contra os medicamentos disponíveis atualmente é uma grande preocupação, sendo grande o interesse das pesquisas dos últimos anos à busca de novos produtos naturais ou sintéticos que apresentem uma boa relação de alto potencial antimicrobiano e baixa toxicidade ao hospedeiro.

Como relatado anteriormente, os óleos essenciais exercem um papel importante na defesa do vegetal contra diversos agentes patológicos, em que, cerca de 60% desses óleos apresentam atividades antifúngicas e 35% possuem atividades antibacterianas. Esses dados podem ser justificados pela ação bacteriostática e/ou bactericida exercida pelos compostos terpenóides. Os mecanismos por meio dos quais estas substâncias atuam são: interferência na integridade e funcionamento da membrana celular bacteriana, a partir da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória, além da interferência na expressão de genes codificadores de fatores de virulência. Sendo assim, os óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon* têm demonstrado fortes propriedades antimicrobianas e, portanto, poderiam produzir alternativas terapêuticas aos antibióticos atuais (Probst, 2012; Greay & Hammer, 2011; Ganjewala, 2009; Lima *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana de substâncias oriundas do metabolismo secundário de espécies vegetais pode ser avaliada quantitativamente ao se determinar a quantia dessa substância que é necessária para inibir o crescimento do microrganismo, esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM). A preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais e suas combinações fazem de estudos como esse o primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes (Ostrosky *et al.*, 2008).

De outro modo, o consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome, selecionando produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem. Com isso, além de sua atuação terapêutica, a utilização dos óleos essenciais extraídos de plantas

aromáticas e medicinais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos e produtos cosméticos, sendo mais seguros quando comparados aos aditivos químicos (Santos *et al.*, 2011; Packer & Luz, 2007).

2.8. Atividade antioxidante

Os radicais livres são pequenas moléculas instáveis formadas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio altamente reativo devido a ausência de um elétron da sua camada mais externa, sendo comumente denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO). Os organismos vivos estão continuamente expostos as ERO exógenas e endógenas ou radicais que causam diferentes danos celulares. A fonte endógena de ERO tem origem no mecanismo de fosforilação oxidativa do metabolismo normal do oxigênio em nosso organismo, enquanto que a exógena consiste em agente físicos ou químicos, como a luz ultravioleta, tabaco e bebida alcoólica (Buchli, 2002).

O desequilíbrio entre a taxa de formação dessas substâncias e sua degradação conduz ao estresse oxidativo e é decorrente de uma produção acelerada de ERO ou da deterioração dos mecanismos envolvidos na proteção contra as ERO. A partir desse processo inicia-se uma série de reações originando alterações em proteínas extracelulares e modificações celulares, sendo o maior dano a peroxidação dos ácidos graxos presentes na dupla camada lipídica das células e, por conseguinte, a morte celular. O principal mecanismo de defesa aos danos oxidativos é o sistema antioxidante, que pode ser classificado em dois grandes grupos: enzimas e as moléculas antioxidantes de baixo peso molecular. Este sistema atua por meio do desenvolvimento de uma resposta ao aumento da concentração de oxigênio, designado para interagir diretamente com as ERO, a fim de prevenir ou retardar significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibir a iniciação ou a propagação de reação de oxidação em cadeia, bem como, prevenir ou reparar danos ocasionados às células pelas ERO (Pereira, 2011; Andrade *et al.*, 2007; Vicentino & Menezes, 2007; Silva *et al.*, 2006).

Quando a capacidade de sequestrar ERO intracelulares é superada, o DNA representa o último alvo, possibilitando a absorção da radiação UVB, o que induziria diretamente mudanças entre as bases pirimídicas adjacentes no filamento de DNA e consequentemente, desempenharia um papel na mutagênese, carcinogênese, envelhecimento, bem como, doenças degenerativas (Silva *et al.*, 2006).

Como exposto anteriormente, alguns metabólitos de espécies vegetais têm demonstrado efeitos protetores contra os danos oxidativos através da inibição ou extinção dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio. Com isso, os antioxidantes oriundos de produtos naturais podem representar uma possibilidade de tratamento e prevenção das doenças mediadas por estresse oxidativo, substituindo total ou parcialmente os antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (Sousa *et al.*, 2007).

2.9. Atividade alelopática

Alelopatia, do grego *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo), é a interferência direta ou indireta de uma planta sobre a outra, através da produção e liberação no ambiente de substâncias químicas com atividade fitotóxica. Esses efeitos podem ser inibitórios ou estimulatórios na germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas de outras espécies. É reconhecido como importante mecanismo ecológico que tem participação decisiva na dinâmica populacional da flora existente num ecossistema, na dominância e sucessão de plantas, formação de comunidades, assim como no manejo e produtividade das culturas, alterando o padrão e a densidade da vegetação (Pires & Oliveira, 2011; Souza Filho, 2002).

No contexto ambiental, as plantas, apesar de autotróficas, são imóveis, não podendo por isto escapar do ataque dos seus inimigos. Sendo assim, as substâncias alelopáticas liberadas dos tecidos vegetais por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e pela decomposição de resíduos vegetais, desempenham como principal função a proteção ou defesa contra o ataque de fitopatógenos e pragas ou invasão de outras plantas (Pires & Oliveira, 2011).

Por outro lado, no âmbito comercial, a perda de produção das culturas causada pelas plantas daninhas, a nível mundial, é estimada em 10% e alcança valores exorbitantes, superiores a 58%, quando analisada apenas no Brasil. Diante desta realidade, o uso de herbicidas sintéticos vem aumentando cada vez mais e traz consigo maiores custos de produção e potencial de danos ao ambiente, como o desenvolvimento de espécies resistentes aos mesmos, o que acarreta uma conseqüente e contínua demanda por novos compostos químicos que apresentem mecanismos bioquímicos de ação diferente daqueles atualmente em uso. Uma das alternativas utilizada pelos

agricultores é a estratégia de manejo das pastagens, através da seleção de espécies forrageiras cujo nível de atividade alelopática possibilite o controle da infestação por plantas indesejáveis, erroneamente denominadas de ervas daninhas. Com esta prática, estandes mais puros, mais densos e mais produtivos são obtidos (Pires & Oliveira, 2011; Belinelo *et al.*, 2008; Souza Filho, 2002).

Atualmente, são conhecidos cerca de 10.000 produtos secundários com ação alelopática, considerados apenas uma pequena parte da quantidade possivelmente existente na natureza. Os monoterpenos são as moléculas químicas mais simples da família terpenóide, apresentando diversas funções biológicas e ecológicas. No ecossistema desempenham um papel importante nas interações planta-planta, mecanismo de defesa e atraentes polinizadores. Estas propriedades dos monoterpenos juntamente com sua ação comprovadamente tóxica para as plantas, mas de forma seletiva, tornam-os alvo de interesse para a agroindústria e sendo a constituição básica dos óleos essenciais, favorece que estes sejam uma possibilidade para a produção de biodefensivos agrícolas com as vantagens ecológicas dos produtos naturais. Contudo, para a comercialização de novos produtos com ações pesticidas a base de óleos essenciais são identificados algumas barreiras, como por exemplo: escassez do recurso natural, necessidade de padronização química e controle de qualidade, além de dificuldades no registro (Pires & Oliveira, 2011; Singh *et al.*, 2006; Isman, 2000).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi caracterizar quimicamente o óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*, assim como, desenvolver uma nanoemulsão a partir do mesmo, avaliando-se as atividades biológicas do óleo puro e de sua forma nanoemulsionada.

3.2. Objetivos específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial de folhas da espécie *Cymbopogon densiflorus*.
- Analisar possíveis mudanças na composição química deste óleo a partir do estudo de sazonalidade.
- Desenvolver e caracterizar a nanoemulsão contendo este óleo essencial.
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e alelopática deste óleo essencial e de sua nanoemulsão.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material botânico

Folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Figura 4) foram coletadas no bairro Bauxita no município de Ouro Preto/MG, Campus Morro do Cruzeiro/UFOP (20°23'51"S; 43°30'40"W), onde ocorre. A exsicata foi depositada no Herbário Prof. José Badini do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente (DEBIO) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB/UFOP), sob o número OUPR 28122.



Figura 4: Exemplos da espécie *Cymbopogon densiflorus*.

4.2. Obtenção do óleo essencial e estudo da sazonalidade

O processo de extração do óleo essencial utilizado foi a hidrodestilação das partes aéreas da espécie vegetal através do hidrodestilador (Linax) por um período de aproximadamente 4 horas. Após a coleta ocorrida por volta das 8 horas da manhã, as folhas frescas foram rasuradas a fim de se reduzir o seu tamanho e obter uma maior superfície de contato e, em seguida, foram pesadas e acondicionadas em um compartimento denominado dorna. O vapor de água ao passar pelo material vegetal extrai os compostos voláteis da planta. O vapor condensa ao chegar ao sistema de condensação, sendo possível coletar o óleo extraído no sistema de decantação. O óleo essencial, assim que obtido, foi colocado em um tubo de ensaio para centrifugação

(Centrífuga Excelsa Baby I[®]) para que houvesse uma separação minuciosa da água através da diferença de densidade e imiscibilidade das fases. O óleo foi então recolhido e pesado em balança (Shimadzu, modelo AUW220D) para cálculo do rendimento (Figura 5). O acondicionamento foi realizado em vidro de penicilina devidamente tampado, ao abrigo de luz com auxílio de papel alumínio e mantido a baixa temperatura em geladeira.



Figura 5: Processo de obtenção do óleo essencial a partir da hidrodestilação.

O estudo da sazonalidade ocorreu durante um ano, com coletas do material vegetal a cada dois meses. Sendo assim, os óleos foram obtidos em maio de 2013 (1), julho de 2013 (2), setembro de 2013 (3), novembro de 2013 (4), janeiro de 2014 (5) e março de 2014 (6).

4.3. Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (Shimadzu, modelo QP2010 com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) no laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram preparadas a partir de 20 µL do óleo essencial e 980 µL de acetato de etila e injetadas sob as seguintes condições de uso: temperatura do injetor: 250 °C; gás de arraste: Hélio; temperatura inicial do forno: 200 °C por 12 minutos atingindo a temperatura de 290 °C a uma velocidade linear de 38,7 cm/s e permanecendo nessa temperatura por 35 minutos. O banco de dados utilizado foi o “*Wiley Mass Spectral Database*”.

O padrão utilizado foi o de hidrocarbonetos de 9 a 25 carbonos e, em seguida, realizou-se o cálculo do índice de Kovats (IK) de acordo com a fórmula abaixo:

$$IK = 100 \times \{n + (N - n)[(t_r \text{ amostra} - t_r n)/(t_r N - t_r n)]\} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, IK é o índice de Kovats, n é o número de átomos de carbonos no n-alcano menor, N é o número de átomos de carbonos no n-alcano maior e t_r é o tempo de retenção.

A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massa e por comparação com espectros de massa de banco de dados, com dados da literatura e pelo índice de Kovats (Adams, 1989).

4.4. Desenvolvimento da nanoemulsão

4.4.1. Obtenção da nanoemulsão

O desenvolvimento da formulação envolveu a elaboração de uma nanoemulsão, baseada em preparações desenvolvidas previamente por Quintão (2013). As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação por inversão de fases (*Emulsion Phase Inversion - EPI*). A técnica consistiu-se em aquecer as fases aquosa e oleosa separadamente em banho-maria (Britania Multi Grill) até uma temperatura de 75 ± 2 °C e, em seguida, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa sob agitação constante

a 600 rpm através do agitador mecânico (Fisatom, modelo 713D) até resfriamento à temperatura ambiente.

A constituição qualitativa e quantitativa final da formulação contendo o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* está descrita na tabela 1. Resumidamente, para a produção da nanoemulsão foram utilizados os tensoativos não iônicos Monooleato de Sorbitano (Span 80®) (lipofílico) e PEG - 40 *Hydrogenated Castor Oil* (Croduret 50 Special®) (hidrofílico), a fase oleosa foi composta por óleo de soja e óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, e por fim, água destilada foi usada como fase aquosa.

Tabela 1: Constituição da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Componentes	Porcentagem (%)
Monooleato de Sorbitano	4,0
PEG - 40 <i>Hydrogenated Castor Oil</i>	6,0
Óleo de soja	5,0
Óleo essencial de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	5,0
Água destilada	80,0

Para os testes de atividade biológica foi necessária a produção de uma formulação que não continha o óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*, a fim de se confirmar que a propriedade apresentada pela nanoemulsão refere-se à presença deste óleo e não dos excipientes utilizados para a sua produção. Com isso, esta formulação foi então denominada de controle da nanoemulsão e obtida da mesma forma descrita anteriormente e com a constituição conforme a tabela 2.

Tabela 2: Constituição do controle da nanoemulsão sem óleo essencial.

Componentes	Porcentagem (%)
Monooleato de Sorbitano	4,0
PEG - 40 <i>Hydrogenated Castor Oil</i>	6,0
Óleo de soja	10,0
Água destilada	80,0

4.4.2. Caracterização da nanoemulsão

4.4.2.1. Análise macroscópica

A análise macroscópica foi realizada após 24 horas da preparação da nanoemulsão, onde, procurou-se observar as características organolépticas e a homogeneidade da formulação.

4.4.2.2. Análise microscópica

Para a análise microscópica, a nanoemulsão estável macroscopicamente foi observada conforme morfologia e homogeneidade dos glóbulos. Em uma lâmina foi adicionada uma gotícula da formulação e adicionada uma lamínula para análise em microscópio (Zeiss - Scope.A1).

4.4.2.3. Determinação do valor de pH

O valor do potencial Hidrogeniônico (pH) da nanoemulsão foi determinado inserindo o eletrodo do peagâmetro (Lutron, modelo PH-221) diretamente na amostra a uma temperatura de 25 °C. Os resultados foram expressos como média das três diferentes determinações.

4.4.2.4. Determinação da condutividade elétrica

Para determinar a condutividade elétrica o eletrodo do condutímetro (Instrutherm, modelo CD-820) foi inserido diretamente na nanoemulsão, à temperatura de 25 °C. Em seguida, o sistema foi aquecido sob agitação magnética (ARE Heating Magnetic Stirrer - Velp[®] Scientifica) e o ponto de inversão de fases foi determinado através da média das temperaturas da maior e menor condutividade elétrica.

4.4.2.5. Determinação do tamanho de partícula

A distribuição de tamanho das partículas na nanoemulsão foi determinada a partir da espectroscopia de correlação de fótons, mais conhecida como espalhamento de luz dinâmico, utilizando o Nanosizer (Beckman Coulter, modelo NS Submicron Particle Size Analyzer). As amostras foram preparadas em um proporção 1:1000, adicionando-se 20 µL da formulação em água ultra pura (MilliQ - Millipore) a fim de se obter 20 mL

da solução final, em que cerca de 2 mL foram adicionados em cubeta de quartzo. As leituras para análise do tamanho de partícula foram realizadas em triplicata e as medidas foram efetuadas sob ângulo de espalhamento de 90 °. Os resultados foram fornecidos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IP).

4.4.2.6. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pelas medidas de mobilidade eletroforética das partículas em suspensão. O equipamento utilizado, Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer Nano series - Nano ZS), dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada terminal de um tubo em forma de "U", onde a amostra foi adicionada para análise.

4.4.2.7. Determinação do comportamento reológico

Para a determinação do comportamento reológico foi utilizado o reômetro (Brookfield, modelo DV-III Ultra Programmable Rheometer) acoplado a um Software Rheocalc. Os períodos para as análises foram após 24 horas, 7 e 14 dias do preparo da formulação e as medidas feitas a partir de 0,5 mL da formulação, transferidos para dispositivo destinado à análise da amostra, spindle CP 40, a 25° C, velocidade de rotação de 0 a 250 rpm, com variação em intervalo de 50 rpm.

4.4.2.8. Ensaio de estabilidade acelerada

a) Estresse térmico

Para a avaliação da estabilidade através do estresse térmico, 2 mL da formulação foram adicionados em um tubo de ensaio e submetidos ao aquecimento em banho-maria (Quimis[®]) na faixa de temperatura de 40 a 80 °C, com um aumento gradativo de 5 °C a cada 30 minutos. A cada aumento de temperatura a nanoemulsão foi analisada macroscopicamente quanto à homogeneidade e a ocorrência de separação de fases e no final do processo foi analisado o tamanho das partículas para confirmação dos resultados. As análises ocorreram em duplicata nos períodos após 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias da preparação da formulação (Maruno, 2009).

A comparação do tamanho médio das partículas após cada intervalo de tempo foi avaliada por análise estatística de acordo com o teste *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) considerando-se um nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) através do *GraphPad Prism 5*.

b) Centrifugação

Para a avaliação da estabilidade através da centrifugação, 1 mL da formulação foi adicionado em eppendorf e submetido a ciclos de 10 minutos de rotação à 7.500, 10.000 e 12.500 rpm em centrífuga (Centrifuge Eppendorf, modelo 5415D). Após cada ciclo foi avaliada macroscopicamente a ocorrência de cremação e de separação de fases e no final do processo foi analisado o tamanho das partículas para confirmação dos resultados. As análises ocorreram em duplicata nos períodos após 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias da preparação da formulação.

A comparação do tamanho médio das partículas após cada intervalo de tempo foi avaliada por análise estatística de acordo com o teste *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) considerando-se um nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) através do *GraphPad Prism 5*.

4.5. Atividade antimicrobiana

4.5.1. Atividade antimicrobiana qualitativa

A atividade antimicrobiana qualitativa foi determinada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel de filtro (Ostrosky *et al.*, 2008). Os microrganismos utilizados nesta investigação foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 14408.

Primeiramente foram preparados os meios de cultura agar Mueller-Hinton, para o crescimento das bactérias, e agar Sabouraud, para o crescimento dos fungos, em água destilada de acordo com as proporções indicadas no produto. Em seguida, os meios juntamente com as placas Petri de vidro foram autoclavados por 25 minutos a uma

pressão de 1 atm. Ao fim desse processo, o material foi retirado da autoclave (Autoclave Vertical CS - Primatec autoclaves) para a confecção das placas a partir da distribuição de forma homogênea dos meios sobre as mesmas e esperou-se até o resfriamento para o enrijecimento do agar. Este procedimento foi realizado em capela (Biosafe® Plus A2 - Equipamento de Segurança Biológica - Veco) para evitar contaminação.

Após a fabricação das placas contendo os meios, foram preparados os inóculos a partir do repique e transferência das colônias em estoque, os quais foram armazenados em estufa para cultura e bacteriologia (Nova Ética 410/4ND) a 37 °C por 24 horas para bactérias e 48 horas para fungos para ativar o crescimento dos microrganismos.

Posteriormente, foram preparadas soluções salinas em uma concentração de 0,9% de NaCl em tubos de ensaio em vidro com tampa para cada espécime e autoclavadas. Após o crescimento das colônias, os microrganismos foram adicionados nas soluções salinas, previamente resfriadas, as quais foram padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL e inoculados com o auxílio de um swab até o esgotamento completo da placa. Na sequência, foram adicionados três discos brancos estéreis em cada placa, os quais foram impregnados com 20 µL dos controles, positivo e negativo, e do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*. Os controles positivos utilizados foram tetraciclina (50 µg/mL) para *E. coli* e *S. aureus*, moxifloxacina (20 µg/mL) para *P. aeruginosa* e cetoconazol (60 µg/mL) para *C. albicans* e o controle negativo foi o dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram, então, incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para bactérias e 48 horas para fungos. E, logo depois, os halos de inibição formados foram medidos. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos através da média do tamanho dos halos de inibição.

Para esta avaliação não se fez necessário a utilização da nanoemulsão, visto que, o intuito foi o de observar para quais microrganismos o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* apresentaria atividade. Após essa constatação, prosseguiu-se com a análise quantitativa para comparação da ação biológica do óleo puro e o formulado.

4.5.2. Atividade antimicrobiana quantitativa

A atividade antimicrobiana revelada na avaliação qualitativa foi quantificada baseando-se no método da microdiluição seriada 1:2, sendo possível a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a que não apresentou crescimento bacteriano (Ostrosky *et al.*, 2008).

Nesta etapa foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços e o meio de cultura foi o caldo Mueller-Hinton, preparado em água destilada de acordo com as proporções indicadas no produto e autoclavado juntamente com as ponteiras a serem utilizadas. Além disso, os inóculos foram preparados de acordo com a metodologia descrita para a avaliação qualitativa. O teste foi realizado em duplicata das soluções do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*, da nanoemulsão contendo este óleo e dos controles, positivo, negativo e da nanoemulsão.

Nos poços para o controle positivo foram adicionados 25 µL de caldo, 25 µL do controle positivo, tetraciclina, moxifloxacina ou cetoconazol de acordo com o microrganismo, e 50 µL do inóculo. Para o controle negativo foram adicionados 25 µL de caldo, 25 µL de DMSO e 50 µL do inóculo. No caso do controle da nanoemulsão foram adicionados 25 µL de caldo, 25 µL de nanoemulsão sem o óleo essencial e 50 µL do inóculo. Já para o óleo essencial foram adicionados, primeiramente, 50 µL de caldo em 8 poços e, logo após, adicionou-se 50 µL deste óleo apenas no primeiro poço e homogeneizou-se a solução seguida da retirada de 50 µL desta, a qual foi adicionada no segundo poço, homogeneizada e retirada, e assim sucessivamente, seguindo o procedimento da diluição seriada. Os 50 µL finais foram descartados e ao término desta etapa foram adicionados 50 µL do inóculo em cada poço, obtendo-se, portanto, o óleo essencial nas concentrações 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512. Por fim, para a nanoemulsão contendo o óleo essencial foi utilizado o mesmo procedimento para o óleo puro, no entanto, foram obtidas 12 concentrações da formulação, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096 e 1/8192. Neste caso, os resultados foram expressos de acordo com a concentração inibitória mínima da formulação e do óleo contido na mesma, visto que as nanoemulsões foram desenvolvidas com a adição de 5% do óleo essencial.

As microplacas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 24 ou 48 horas, dependendo do microrganismo. Em seguida, cada poço foi repicado em placa Petri com o auxílio de um swab e incubadas novamente nas mesmas condições para visualização e confirmação de onde houve crescimento bacteriano. Posteriormente, as placas foram analisadas e determinou-se a CIM.

4.6. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), caracterizado por ser estável em virtude da deslocalização do elétron livre (os elétrons não estão associados a um único átomo ou a uma ligação covalente) sobre a extensão da molécula, de modo que a mesma não dimerise, como seria o caso de outros radicais livres (Sousa *et al.*, 2007).

O padrão utilizado foi o ácido gálico e para obtenção das diferentes concentrações foram preparadas duas soluções estoque de 0,2 mg/mL (SE 1) e 1 mg/mL (SE 2). Alíquotas foram então pipetadas a fim de se obter soluções finais de 1 a 150 µg/mL. A estas amostras foram adicionados 2 mL de solução de DPPH a 0,004% m/v em etanol. O volume final foi ajustado para 2,4 mL com a adição de etanol (Tabela 3).

Tabela 3: Preparo das concentrações para a curva do padrão ácido gálico.

Concentrações finais (µg/mL)	Solução estoque (µL)	Etanol (µL)	DPPH 0,004% m/v em etanol (µL)
1	12 (SE 1)	388	2000
2	24 (SE 1)	376	2000
3	36 (SE 1)	364	2000
4	48 (SE 1)	352	2000
5	60 (SE 1)	340	2000
10	120 (SE 1)	280	2000
15	180 (SE 1)	220	2000
20	240 (SE 1)	160	2000
25	300 (SE 1)	100	2000
30	360 (SE 1)	40	2000
40	96 (SE 2)	304	2000
50	120 (SE 2)	280	2000
100	240 (SE 2)	160	2000
150	360 (SE 2)	40	2000

As amostras analisadas foram o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, a nanoemulsão contendo este óleo e o controle da nanoemulsão. Para obtenção das diferentes concentrações foram preparadas duas soluções estoque de 60 mg/mL (SE 3) e 300 mg/mL (SE 4) para cada amostra. Alíquotas foram então pipetadas a fim de se obter soluções finais de 0,5 a 50 mg/mL. A estas amostras foram adicionados 2 mL de solução de DPPH a 0,004% m/v em etanol. O volume final foi ajustado para 2,4 mL com a adição de etanol (Tabela 4).

Tabela 4: Preparo das concentrações para as curvas de óleo essencial, nanoemulsão com óleo essencial e controle da nanoemulsão.

Concentrações finais (mg/mL)	Solução estoque (µL)	Etanol (µL)	DPPH 0,004% m/v em etanol (µL)
0,5	20 (SE 3)	380	2000
1	40 (SE 3)	360	2000
2,5	100 (SE 3)	300	2000
5	200 (SE 3)	200	2000
10	400 (SE 3)	0	2000
15	120 (SE 4)	280	2000
20	160 (SE 4)	240	2000
25	200 (SE 4)	200	2000
30	240 (SE 4)	160	2000
40	320 (SE 4)	80	2000
50	400 (SE 4)	0	2000

Além da preparação do padrão ácido gálico e das amostras foi necessário a obtenção do controle, uma solução contendo apenas 2 mL de DPPH, com o volume ajustado para 2,4 mL a partir da adição de etanol, o qual foi utilizado nos cálculos para determinação da porcentagem de inibição do radical livre. Em seguida, todo o material foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. O DPPH, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil-picrilhidrazina. Esta redução pode ser acompanhada espectrometricamente no comprimento de onda de 517 nm pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança da coloração violeta escura original da solução descorando com o transcorrer da reação para uma variação de violeta clara a amarelo (Figura 6). Sendo assim, esta mudança pôde ser medida através das absorvâncias obtidas em espectrofotômetro (Micronal, modelo B382) a 517 nm. Primeiramente, foi

realizada a leitura apenas do etanol para zerar o aparelho e posteriormente, a medida da solução contendo apenas o DPPH em etanol (sem amostra), seguida do padrão e das amostras. O teste foi realizado em triplicata e a capacidade de sequestrar os radicais livres foi calculada com base na fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Amostra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que, A_{DPPH} é a absorbância da solução contendo apenas o radical livre DPPH em etanol (sem amostra) e A_{Amostra} é a absorbância das amostras e o padrão ácido gálico.

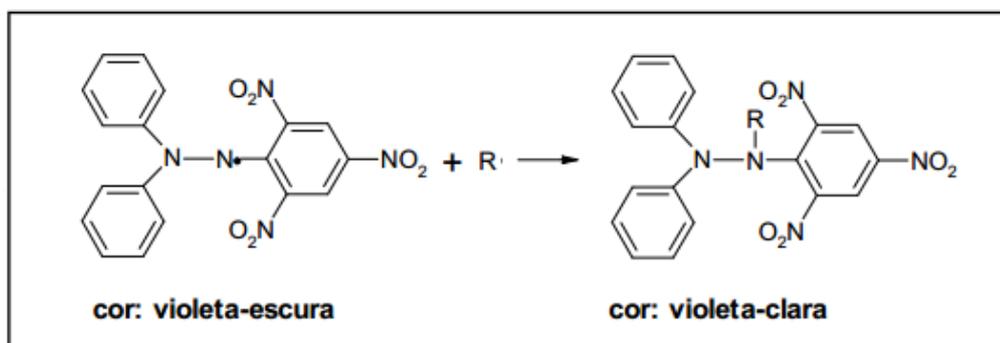


Figura 6: Estabilização do radical livre DPPH. (Fonte: Rufino *et al.*, 2007)

Finalmente, a curva do padrão foi plotada no gráfico junto às amostras de modo a permitir a comparação da porcentagem de inibição para cada concentração. Os resultados foram expressos a partir do cálculo da $CI_{50\%}$, ou seja, a concentração necessária para reduzir 50% do DPPH após o equilíbrio da reação.

4.7. Atividade alelopática

A avaliação da atividade alelopática foi realizada a partir do método de bioensaios de germinação sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pepino (*Cucumis sativus*). Nos testes de atividade fitotóxica, normalmente são utilizadas plantas sensíveis que, em curto espaço de tempo apresentam respostas eficazes, mesmo na presença de baixa concentração de aleloquímicos, o que justifica a escolha dessas espécies.

Durante os ensaios foram utilizadas placas Petri descartáveis e estéreis de 6 cm, adicionando-se um papel de filtro autoclavado de mesmo diâmetro. Este sistema foi umedecido com 1 mL dos controles e das amostras. O controle positivo foi uma solução

aquosa de $ZnCl_2$ a 5%, o controle negativo apenas água destilada e o controle da nanoemulsão sem o óleo essencial. As amostras analisadas foram o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e a nanoemulsão contendo este óleo.

O óleo essencial foi diluído de forma seriada 1:2 em éter etílico de modo a obtê-lo nas concentrações de 50 a 3,12 $\mu\text{L}/\text{mL}$, as quais foram adicionadas nas placas. Em seguida, aguardou-se a evaporação do solvente orgânico e o volume evaporado foi substituído por água destilada. Dessa forma, houve a diluição e impregnação do óleo no papel de filtro de forma homogênea sem a posterior interferência do éter etílico nos resultados. Essas concentrações foram selecionadas a fim de facilitar a comparação com a formulação, visto que a nanoemulsão contém 5% do óleo essencial. Sendo assim, as concentrações da nanoemulsão foram preparadas diluindo-a em água destilada de modo a obtê-la nas proporções de 100 a 0,19%, ou seja, as concentrações de óleo essencial contidas nessas amostras seriam de 50 a 0,09 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Posteriormente, as sementes, previamente esterilizadas imergindo-as em solução de hipoclorito de sódio a 20% durante 10 minutos, foram secas e adicionadas nas placas. O teste foi realizado em triplicata e em cada placa foram adicionadas 20 sementes de alface e, no caso do pepino e tomate, foram adicionadas 10 sementes. O material foi então deixado a temperatura ambiente de acordo com o tempo de germinação para cada espécie, 5, 6 e 9 dias para alface, pepino e tomate, respectivamente, e regado quando necessário. Após esse período, as médias do número de sementes germinadas e do tamanho das raízes das plantas foram determinadas. Seguido dos cálculos de porcentagem de variação da germinação (VG) e do crescimento da raiz (VCR), conforme as fórmulas abaixo:

$$\% \text{VG} = [(N_{\text{amostra}} - N_{\text{controle}})/N_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, N_{amostra} é o número de sementes germinadas nas amostras e N_{controle} é o número de sementes germinadas no controle negativo, com apenas água destilada.

$$\% \text{VCR} = [(CM_{\text{amostra}} - CM_{\text{controle}})/CM_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde, CM_{amostra} é o comprimento médio das raízes nas amostras e CM_{controle} é o comprimento médio das raízes no controle negativo, com apenas água destilada.

Por fim, as curvas do óleo essencial puro e de sua forma nanoemulsionada foram comparadas e os resultados foram expressos a partir do cálculo da $CI_{50\%}$, ou seja, a concentração de cada amostra capaz de inibir 50% da germinação e do crescimento médio da raiz para cada espécie (Dutka, 1989; Greene *et al.*, 1988; Wang, 1987).

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do óleo essencial e estudo da sazonalidade

O óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* apresentou-se como um líquido amarelado, viscoso e com forte odor característico. Os membros do gênero *Cymbopogon* produzem óleos essenciais com um aroma característico devido à presença significativa de monoterpenos (Castro *et al.*, 2010; Ganjewala, 2009).

Segue abaixo na tabela 5 o rendimento para cada coleta:

Tabela 5: Rendimento do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* de acordo com a coleta.

Coleta	Rendimento (%)
(1) Maio de 2013	0,06277
(2) Julho de 2013	0,05437
(3) Setembro de 2013	0,07621
(4) Novembro de 2013	0,12652
(5) Janeiro de 2014	0,10840
(6) Março de 2014	0,11665

Sabe-se que as espécies vegetais respondem às variações ambientais ao longo das estações do ano, sendo assim, foi possível constatar que os rendimentos foram maiores entre os meses de novembro a março, fato este que pode ser justificado devido as características climáticas da região de Ouro Preto onde a espécie foi coletada. A localidade apresenta um clima tropical de altitude, com maiores proporções de chuvas durante os meses de dezembro a março, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento vegetativo superior da espécie e consequentemente maior rendimento do óleo essencial, visto que, em ambientes tropicais onde a sazonalidade na precipitação é pronunciada, a época de seca comumente determina a fenologia, limitando o crescimento das plantas neste período (Marques & Oliveira, 2004). Além disso, a formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva destes metabólitos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Folhas de *C. densiflorus* coletadas no mês de abril (Zâmbia) e submetidas a hidrodestilação por cleveger, apresentaram um óleo essencial amarelado com rendimento equivalente a 1,7% (Chisowa, 1997). Em outro estudo, folhas coletadas na

estação chuvosa, entre os meses de outubro a maio (Congo), apresentaram um rendimento de cerca de 1%, onde 10 mL de óleo essencial foram obtidos para cada 1 Kg de material vegetal (Takaisi-Kikuni, Tshilanda & Babady, 2000).

5.2. Caracterização química dos óleos essenciais

Os dados contidos nas tabelas de 6 a 11 informam a caracterização de cada óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* coletadas durante o estudo da sazonalidade.

Tabela 6: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em maio de 2013 (1).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	4,792	926,87	-	-	0,05
2**	6,790	1003,48	-	-	0,08
3	7,388	1022,68	1024	<i>p</i> -cimeno	0,29
4	7,540	1027,09	1029	Limoneno	0,11
5**	8,957	1068,25	-	-	0,09
6	9,670	1088,96	1085	meta-cimeno	0,20
7	10,939	1122,16	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	13,13
8**	11,025	1124,30	-	-	0,09
9	11,507	1136,32	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	9,96
10	12,015	1148,99	1149	Isopulegol	0,23
11	12,239	1154,47	1158	Óxido nerol	1,22
12**	12,746	1167,21	-	-	0,79
13	13,614	1188,85	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	18,99
14**	13,900	1195,98	-	-	0,08
15	14,119	1201,36	1196	<i>cis</i> -piperitol	11,52
16	14,244	1204,29	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,15
17	14,350	1206,78	1200	<i>cis</i> -4-caranona	3,89
18**	14,426	1208,57	-	-	0,57
19	14,596	1212,56	1205	Verbenona	0,85
20	14,829	1218,03	1208	<i>trans</i> -piperitol	4,23
21	14,898	1219,65	1216	<i>trans</i> -carveol	2,45
22	15,374	1230,83	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	17,29
23**	15,461	1232,87	-	-	0,57
24	15,923	1243,72	1243	Carvona	4,50
25	16,200	1250,23	1249	Hexanoato de isoamila	0,43
26**	16,984	1268,64	-	-	0,21
27	17,234	1274,51	1271	Aldeído perilla	0,62
28	17,744	1286,49	1283	2-octinoato de etila	0,27
29**	17,971	1291,82	-	-	0,15
30**	21,680	1379,30	-	-	0,12
31**	22,129	1389,90	-	-	0,26
32	24,120	1438,20	1441	Butanoato de 2-fenil etila	0,20

33	24,465	1446,63	1445	Octanoato de isoamila	0,75
34	29,611	1575,45	1583	Óxido cariofileno	0,14
35	32,024	1638,74	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,30
36**	43,418	1965,80	-	-	0,69
37**	49,283	2155,11	-	-	1,87
38**	49,455	2160,89	-	-	0,24
39**	49,580	2165,08	-	-	0,53
40**	50,028	2180,12	-	-	0,26
41**	52,102	2251,98	-	-	0,54
42	53,467	2299,85	2300	n-tricosano	0,11
43**	53,864	2314,29	-	-	0,20
44	56,221	2400,03	2400	n-tetracosano	0,18
45*,**	58,865	-	-	-	0,24
46*,**	59,494	-	-	-	0,41
Monoterpeno hidrocarbônico					10,56
Monoterpeno oxigenado					79,97
Sesquiterpeno oxigenado					1,19
Diterpeno hidrocarbônico					0,29
Total					92,01

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, * Não foi possível calcular o IK, ** Não foi possível a identificação do composto.

Tabela 7: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em julho de 2013 (2).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	6,788	1005,25	-	-	0,24
2	7,379	1022,42	1024	<i>p</i> -cimeno	0,79
3	7,532	1026,86	1029	Limoneno	0,17
4**	8,957	1068,25	-	-	0,12
5	9,678	1089,19	1085	meta-cimeno	0,29
6**	9,899	1095,61	-	-	0,11
7	10,914	1121,54	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	10,07
8	11,483	1135,72	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	7,90
9	12,024	1149,21	1149	Isopulegol	0,16
10	12,232	1154,40	1158	Óxido nerol	0,33
11**	12,745	1167,19	-	-	0,40
12	13,601	1188,53	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	20,68
13	14,099	1200,89	1196	<i>cis</i> -piperitol	12,18
14	14,240	1204,20	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,18
15	14,347	1206,71	1200	<i>cis</i> -4-caranona	6,78
16**	14,419	1208,40	-	-	0,61
17	14,589	1212,40	1205	Verbenona	1,49
18	14,807	1217,51	1208	<i>trans</i> -piperitol	3,20
19	14,881	1219,25	1216	<i>trans</i> -carveol	2,37
20	15,357	1230,45	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	18,09
21**	15,447	1232,55	-	-	0,48
22	15,909	1243,40	1243	Carvona	4,35
23	16,198	1250,18	1249	Hexanoato de isoamila	0,62
24	17,227	1274,35	1271	Aldeído perilla	0,88
25	17,736	1286,30	1283	2-octinoato de etila	0,21
26	24,120	1438,20	1441	Butanoato de 2-fenil etila	0,25
27	24,456	1446,41	1445	Octanoato de isoamila	1,04
28	28,983	1559,46	1563	(E)-nerolidol	0,10
29	29,434	1570,94	1578	Espatulenol	0,17
30	29,596	1575,07	1583	Óxido cariofileno	0,24
31	32,016	1638,52	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,53
32**	39,070	1835,07	-	-	0,41
33	39,311	1842,15	1847	Octanoato de 2-fenil etila	0,15
34**	49,271	2154,71	-	-	2,30
35	49,523	2163,17	2149	Albienol	0,81
36**	50,001	2179,22	-	-	0,24
37**	52,090	22251,56	-	-	1,06
Monoterpeno hidrocarbônico					1,25
Monoterpeno oxigenado					89,74
Sesquiterpeno oxigenado					2,23
Diterpeno oxigenado					0,81
Total					94,03

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, ** Não foi possível a identificação do composto.

Tabela 8: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em setembro de 2013 (3).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	6,784	1005,14	-	-	0,50
2	7,379	1022,42	1024	<i>p</i> -cimeno	1,24
3	7,534	1026,92	1029	Limoneno	0,25
4	8,439	1053,20	1055	Isobutanoato de pentila	0,06
5**	8,959	1068,31	-	-	0,06
6	9,678	1089,19	1085	meta-cimeneno	0,38
7**	9,892	1095,41	-	-	0,11
8	10,901	1121,21	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	8,18
9	11,473	1135,47	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	6,73
10	12,231	1154,37	1158	Óxido nerol	0,39
11**	12,743	1167,14	-	-	0,39
12**	13,290	1180,77	-	-	0,10
13	13,597	1188,43	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	22,24
14	14,088	1200,63	1196	<i>cis</i> -piperitol	12,25
15	14,238	1204,15	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,17
16	14,343	1206,62	1200	<i>cis</i> -4-caranona	6,08
17**	14,416	1208,33	-	-	0,59
18	14,586	1212,32	1205	Verbenona	1,30
19	14,801	1217,37	1208	<i>trans</i> -piperitol	2,64
20	14,874	1219,09	1216	<i>trans</i> -carveol	2,61
21**	15,116	1224,77	-	-	0,25
22	15,351	1230,29	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	19,27
23**	15,440	1232,38	-	-	0,53
24	15,905	1243,30	1243	Carvona	4,39
25	16,192	1250,04	1249	Hexanoato de isoamila	0,70
26	17,225	1274,30	1271	Aldeído perilla	0,86
27	17,736	1286,30	1283	2-octinoato de etila	0,16
28	24,117	1438,13	1441	Butanoato de 2-fenil etila	0,32
29	24,456	1446,41	1445	Octanoato de isoamila	1,16
30	32,015	1638,50	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,65
31**	39,073	1835,16	-	-	0,45
32	39,318	1842,36	1847	Octanoato de 2-fenil etila	0,10
33**	49,273	2154,78	-	-	2,47
34**	49,390	2158,71	-	-	0,14
35	49,524	2163,20	2149	Albienol	0,95
36**	49,998	2179,12	-	-	0,24
37**	52,086	2251,42	-	-	1,07
Monoterpeno hidrocarbônico					1,87
Monoterpeno oxigenado					88,35
Sesquiterpeno oxigenado					1,91
Diterpeno oxigenado					0,95
Total					93,08

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, ** Não foi possível a identificação do composto.

Tabela 9: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em novembro de 2013 (4).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	4,796	927,03	-	-	0,04
2**	6,794	1005,43	-	-	0,10
3	7,384	1022,56	1024	<i>p</i> -cimeno	0,72
4	7,542	1027,15	1029	Limoneno	8,74
5	8,440	1053,23	1055	Isobutanoato de pentila	0,09
6**	8,960	1068,34	-	-	0,15
7	9,688	1089,48	1085	meta-cimeno	0,24
8	10,928	1121,88	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	16,96
9	11,488	1135,65	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	10,65
10	12,237	1154,52	1158	Óxido nerol	0,36
11**	12,733	1166,89	-	-	0,91
12	13,579	1187,98	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	13,88
13**	13,890	1195,73	-	-	0,12
14	14,085	1200,56	1196	<i>cis</i> -piperitol	9,30
15	14,232	1204,01	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,15
16	14,342	1206,59	1200	<i>cis</i> -4-caranona	5,15
17**	14,418	1208,38	-	-	0,74
18	14,589	1212,40	1205	Verbenona	0,58
19	14,802	1217,40	1208	<i>trans</i> -piperitol	4,39
20	14,873	1219,06	1216	<i>trans</i> -carveol	1,86
21	15,334	1229,89	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	12,48
22**	15,440	1232,38	-	-	0,44
23	15,908	1243,37	1243	Carvona	4,78
24	16,194	1250,09	1249	Hexanoato de isoamila	0,41
25	17,231	1274,44	1271	Aldeído perilla	0,45
26	17,733	1286,23	1283	2-octinoato de etila	0,36
27**	17,962	1291,61	-	-	0,20
28	24,126	1438,35	1441	Butanoato de 2-fenil etila	0,24
29	24,460	1446,51	1445	Octanoato de isoamila	0,45
30	32,026	1638,79	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,26
31**	49,275	2154,85	-	-	3,13
32	49,535	2163,57	2149	Albienol	0,31
33**	52,093	2251,66	-	-	1,37
Monoterpeno hidrocarbônico					9,70
Monoterpeno oxigenado					82,09
Sesquiterpeno oxigenado					0,71
Diterpeno oxigenado					0,31
Total					92,81

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, ** Não foi possível a identificação do composto.

Tabela 10: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em janeiro de 2014 (5).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	6,790	1005,31	-	-	0,29
2	7,383	1022,53	1024	<i>p</i> -cimeno	0,87
3	7,538	1027,04	1029	Limoneno	4,31
4**	8,960	1068,34	-	-	0,17
5	9,686	1089,42	1085	meta-cimeno	0,23
6	10,919	1121,66	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	13,98
7	11,485	1135,77	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	10,03
8	12,231	1154,37	1158	Óxido nerol	0,34
9**	12,733	1166,89	-	-	1,04
10	13,579	1187,98	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	14,52
11	14,089	1200,65	1196	<i>cis</i> -piperitol	11,43
12	14,239	1204,18	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,18
13	14,345	1206,66	1200	<i>cis</i> -4-caranona	6,16
14**	14,419	1208,40	-	-	0,91
15	14,590	1212,42	1205	Verbenona	0,54
16	14,803	1217,42	1208	<i>trans</i> -piperitol	3,99
17	14,873	1219,06	1216	<i>trans</i> -carveol	1,98
18	15,339	1230,01	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	13,95
19**	15,438	1232,33	-	-	0,49
20	15,907	1243,35	1243	Carvona	5,25
21	16,192	1250,04	1249	Hexanoato de isoamila	0,35
22	17,233	1274,49	1271	Aldeído perilla	0,56
23	17,734	1286,26	1283	2-octinoato de etila	0,43
24**	17,968	1291,75	-	-	0,28
25	24,463	1446,59	1445	Octanoato de isoamila	0,55
26	32,030	1638,90	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,32
27**	49,283	2155,11	-	-	4,22
28	49,538	2163,67	2149	Albienol	0,59
29**	52,104	2252,05	-	-	2,03
Monoterpeno hidrocarbônico					5,41
Monoterpeno oxigenado					83,69
Sesquiterpeno oxigenado					0,87
Diterpeno oxigenado					0,59
Total					90,56

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, **Não foi possível a identificação do composto.

Tabela 11: Caracterização do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas em março de 2014 (6).

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1**	6,789	1005,28	-	-	0,55
2	7,383	1022,53	1024	<i>p</i> -cimeno	1,25
3	7,536	1026,98	1029	Limoneno	1,04
4**	8,959	1068,31	-	-	0,18
5	9,684	1089,36	1085	meta-cimeno	0,27
6	10,920	1121,69	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	13,73
7**	11,000	1123,68	-	-	0,07
8	11,486	1135,80	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	9,72
9	12,234	1154,45	1158	Óxido nerol	0,39
10**	12,732	1166,86	-	-	0,97
11**	13,310	1181,27	-	-	0,16
12	13,586	1188,15	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	15,90
13**	13,895	1195,86	-	-	0,16
14	14,090	1200,68	1196	<i>cis</i> -piperitol	12,13
15	14,235	1204,08	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,20
16	14,349	1206,76	1200	<i>cis</i> -4-caranona	6,89
17**	14,419	1208,40	-	-	0,95
18	14,587	1212,35	1205	Verbenona	0,80
19	14,804	1217,44	1208	<i>trans</i> -piperitol	3,60
20	14,874	1219,09	1216	<i>trans</i> -carveol	2,09
21**	15,172	1226,09	-	-	0,10
22	15,346	1230,17	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	14,97
23**	15,441	1232,40	-	-	0,41
24	15,909	1243,40	1243	Carvona	4,84
25	16,196	1250,14	1249	Hexanoato de isoamila	0,38
26	17,229	1274,40	1271	Aldeído perilla	0,63
27	17,731	1286,19	1283	2-octinoato de etila	0,33
28**	17,965	1291,68	-	-	0,23
29	24,463	1446,59	1445	Octanoato de isoamila	0,63
30	32,030	1638,90	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,21
31**	49,277	2154,91	-	-	3,60
32	49,527	2163,30	2149	Albienol	0,67
33**	49,999	2179,15	-	-	0,10
34**	52,100	2251,91	-	-	1,85
Monoterpeno hidrocarbônico					2,56
Monoterpeno oxigenado					86,60
Sesquiterpeno oxigenado					0,84
Diterpeno oxigenado					0,67
Total					90,67

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, ** Não foi possível a identificação do composto.

Foi possível a identificação de mais de 90% da constituição química dos óleos essenciais obtidos nas seis coletas. Análises dos cromatogramas dos óleos essenciais revelaram suas composições constituídas principalmente por monoterpenos, apresentando como compostos majoritários o *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (Figura 7), os quais se mantiveram no decorrer de todo o ano e muito provavelmente são os responsáveis pelas atividades apresentadas por esse produto natural, seja sob formas isoladas ou em ação sinérgica com outros constituintes.

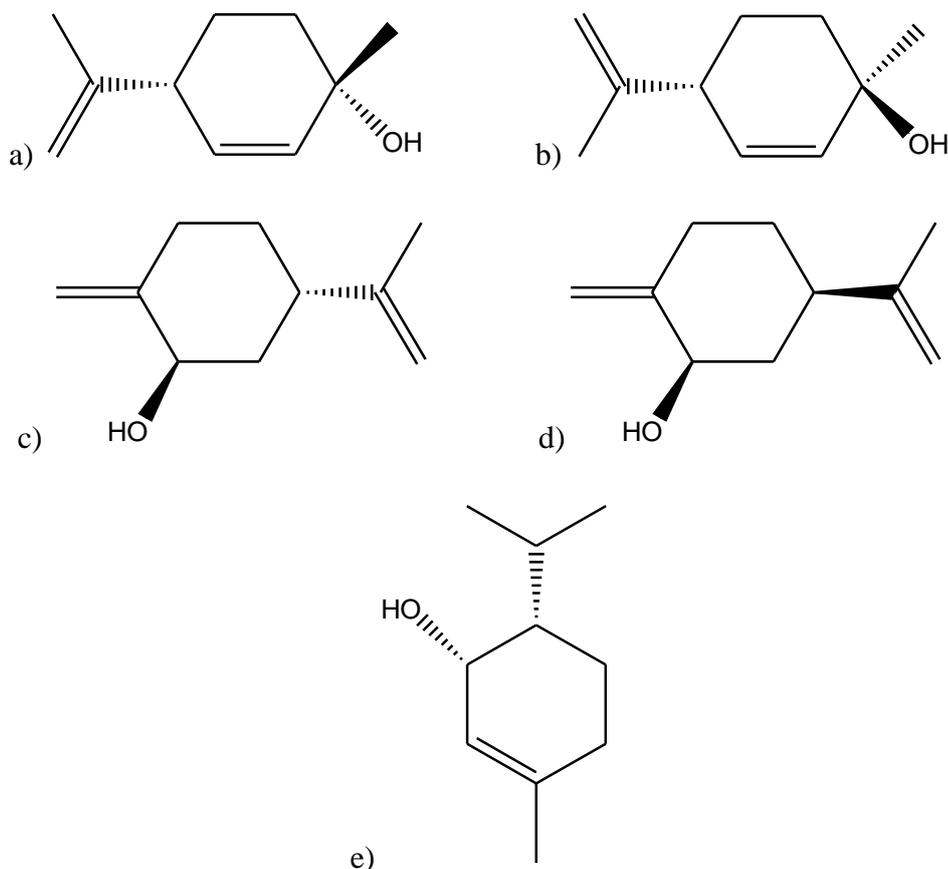


Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais constituintes monoterpênicos presentes no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*. a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol. b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol. c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol. d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol. e) *cis*-piperitol.

Tabela 12: Concentração relativa (%) dos constituintes identificados no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* para seis coletas diferentes.

Composto	Concentração relativa (%) dos constituintes identificados nos óleos essenciais (OE)					
	OE 1	OE 2	OE 3	OE 4	OE 5	OE 6
<i>p</i> -cimeno	0,29	0,79	1,24	0,72	0,87	1,25
Limoneno	0,11	0,17	0,25	8,74	4,31	1,04
Isobutanoato de pentila	-	-	0,06	0,09	-	-
Meta-cimeno	0,20	0,29	0,38	0,24	0,23	0,27
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	13,13	10,07	8,18	16,96	13,98	13,73
<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	9,96	7,90	6,73	10,65	10,03	9,72
Isopulegol	0,23	0,16	-	-	-	-
Óxido nerol	1,22	0,33	0,39	0,36	0,34	0,39
<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	18,99	20,68	22,24	13,88	14,52	15,90
<i>cis</i> -piperitol	11,52	12,18	12,25	9,30	11,43	12,13
<i>trans</i> -diidrocarvona	0,15	0,18	0,17	0,15	0,18	0,20
<i>cis</i> -4-caranona	3,89	6,78	6,08	5,15	6,16	6,89
Verbenona	0,85	1,49	1,30	0,58	0,54	0,80
<i>trans</i> -piperitol	4,23	3,20	2,64	4,39	3,99	3,60
<i>trans</i> -carveol	2,45	2,37	2,61	1,89	1,98	2,09
<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	17,29	18,09	19,27	12,48	13,95	14,97
Carvona	4,50	4,35	4,39	4,78	5,25	4,84
Hexanoato de isoamila	0,43	0,62	0,70	0,41	0,35	0,38
Aldeído perilla	0,62	0,88	0,86	0,45	0,56	0,63
2-octinoato de etila	0,27	0,21	0,16	0,36	0,43	0,33
Butanoato de 2-fenil etila	0,20	0,25	0,32	0,24	-	-
Octanoato de isoamila	0,75	1,04	1,16	0,45	0,55	0,63
(E)-nerolidol	-	0,10	-	-	-	-
Espatulenol	-	0,17	-	-	-	-
Óxido cariofileno	0,14	0,24	-	-	-	-
Hexanoato de 2-fenil etila	0,30	0,53	0,65	0,26	0,32	0,21
Octanoato de 2-fenil etila	-	0,15	0,10	-	-	-
Albienol	-	0,81	0,95	0,31	0,59	0,67
n-tricosano	0,11	-	-	-	-	-
n-tetracosano	0,18	-	-	-	-	-
Total	92,01	94,03	93,08	92,81	90,56	90,67

Ademais, foi possível observar que o isopulegol e o óxido cariofileno ocorreram apenas nos óleos 1 e 2. O butanoato de 2-fenil etila ocorreu nos óleos 1, 2, 3 e 4. n-tricosano e n-tetracosano ocorreram apenas no óleo 1. (E)-nerolidol e espatulenol ocorreram apenas no óleo 2. Octanoato de 2-fenil etila ocorreu apenas nos óleos 2 e 3. Isobutanoato de pentila ocorreu apenas nos óleos 3 e 4. E o albiénol ocorreu nos óleos 2, 3, 4, 5 e 6, conforme a tabela 12.

O estudo da composição do óleo essencial de várias espécies de *Cymbopogon* revelou os monoterpenos como sendo os principais constituintes, no entanto, foi possível observar que a composição destes é marcadamente variada entre as espécies. Além disso, o teor de óleo essencial e sua constituição são muito influenciados pelo clima, época, efeitos diurnos e ontogenia (Ganjewala, 2009).

Chisowa (1997) ao caracterizar o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* coletadas na região de Zâmbia identificou 17 componentes, sendo que mais de 70% dos mesmos equivalem aos do nosso estudo, observando a presença principalmente de monoterpenos oxigenados e hidrocarbônicos. Fato este que também pôde ser confirmado por Barbosa (2007), que ao identificar os constituintes presente neste óleo, encontrou como majoritários o *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *trans-p*-menta-2-8-dien-1-ol, *cis*-carveol e *cis-p*-menta-2-8-dien-1-ol, dentre as 24 substâncias, as quais se igualam em mais de 58% aos nossos resultados.

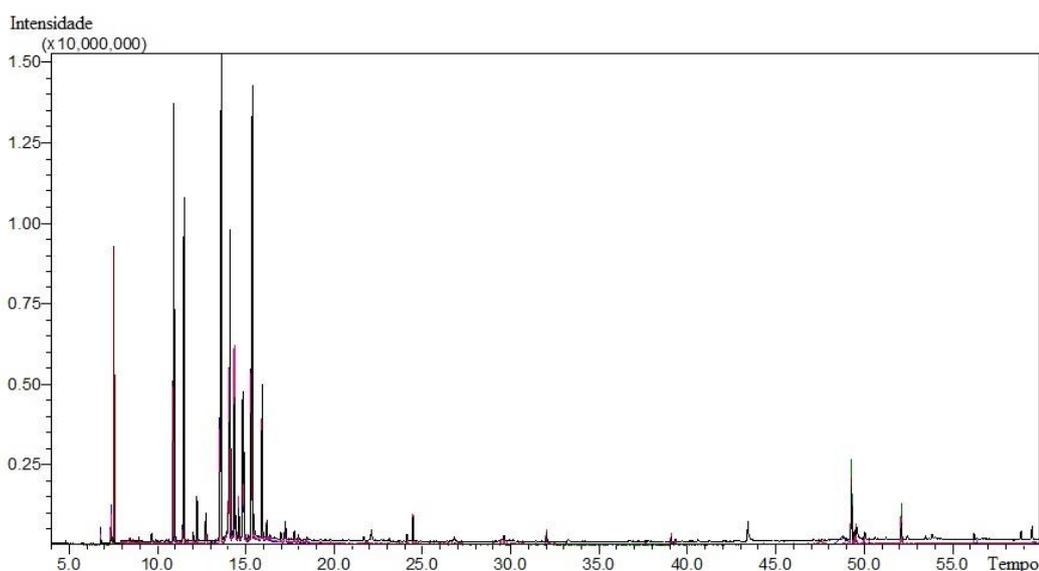


Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas referente à caracterização dos óleos essenciais de folhas de *Cymbopogon densiflorus* coletadas durante o estudo da sazonalidade.

A figura 8 representa a sobreposição dos cromatogramas das seis amostras coletadas. É possível perceber que a diferença entre os mesmos são mínimas e ao analisarmos as porcentagens dos constituintes identificados, observamos que mais de 90% de sua constituição é preservada durante todo o ano. Fato este que possibilita a coleta e obtenção do óleo essencial em períodos diferentes sem que haja perda significativa das suas características, garantindo, assim, um alto controle de qualidade na produção de fitoterápicos a partir da reprodutibilidade e constâncias de princípios ativos do óleo essencial.

5.3. Desenvolvimento da nanoemulsão

5.3.1. Obtenção da nanoemulsão

As nanoemulsões obtidas foram analisadas e caracterizadas para confirmação de sua estabilidade.

5.3.2. Caracterização da nanoemulsão

5.3.2.1. Análise macroscópica

As nanoemulsões revelam-se como líquidos de aparência leitosa, reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade (Silva, 2004).

Na análise macroscópica realizada após 24 horas do preparo da nanoemulsão, esta apresentou um aspecto branco leitoso (Figura 9) e com o odor característico do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*. Além disso, observou-se que não houve alterações como a separação de fases e as características organolépticas também não alteraram, ou seja, não foram identificados sinais de instabilidade, o que a considera adequada para os experimentos seguintes.



Figura 9: Nanoemulsão obtida a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

5.3.2.2. Análise microscópica

Na análise microscópica foi possível confirmar a homogeneidade da formulação e a ausência de estruturas micrométricas (Figura 10).



Figura 10: Fotomicroscopia da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

5.3.2.3. Determinação do valor de pH

A análise do valor do pH é um teste importante durante o monitoramento da estabilidade das nanoemulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres (Martini, 2005; Fronza, Campos & Teixeira, 2004).

A nanoemulsão apresentou valor de pH equivalente a $3,277 \pm 0,143$ (Tabela 13). Embora este valor seja baixo, a formulação permaneceu estável durante todo o período.

Tabela 13: Valores das replicatas da determinação do pH da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Nanoemulsão	pH
A	3,12
B	3,31
C	3,40
Média	$3,277 \pm 0,143$

5.3.2.4. Determinação da condutividade elétrica

A condutividade elétrica pode ser um parâmetro indicativo de instabilidade e influenciar na granulometria das emulsões, uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência e a diminuição com a agregação dos glóbulos (Brasil, 2004). Conforme tabela 14, o valor da condutividade elétrica foi de $159,867 \pm 34,883$ $\mu\text{s}/\text{cm}$ a 25°C .

Tabela 14: Valores das replicatas da determinação da condutividade elétrica e do ponto de inversão de fases da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Nanoemulsão	Condutividade elétrica à 25°C ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	Temperatura de inversão de fases ($^\circ\text{C}$)
A	167,20	71,40
B	121,90	74,80
C	190,50	73,75
Média	$159,867 \pm 34,883$	$73,317 \pm 1,741$

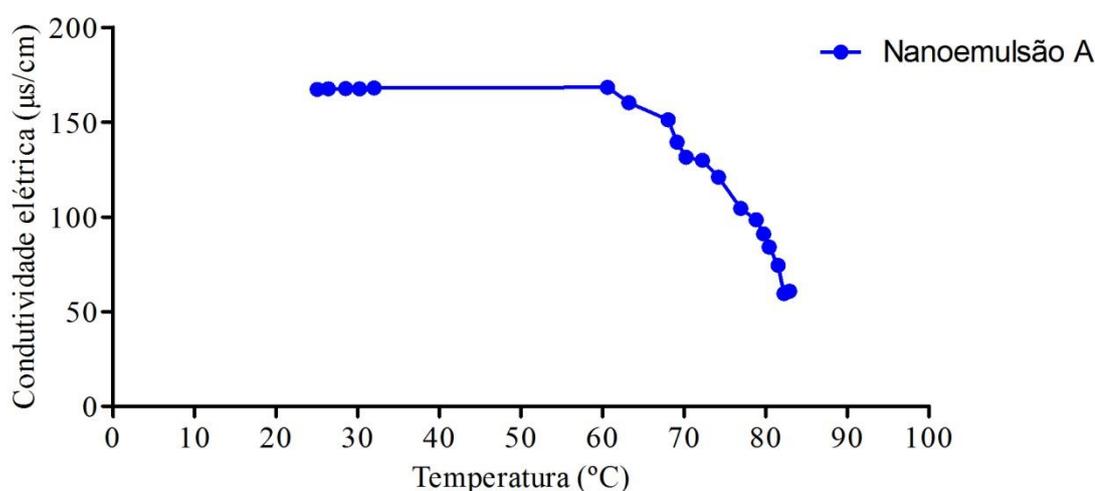


Figura 11: Perfil da condutividade elétrica de acordo com a temperatura para uma replicata da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

O ponto de inversão de fases é identificado pelo aumento súbito no valor da condutividade da amostra quando a emulsão originalmente é A/O, ou diminuição repentina em emulsões O/A. Como pôde ser observado na figura 11, o perfil da condutividade elétrica da nanoemulsão revelou um ligeiro aumento seguido da redução brusca dos valores. Este fato, então, confirma que a formulação trata-se de uma nanoemulsão O/A, visto que a fase contínua hidrofílica apresenta valores maiores de

condutividade comparada com a lipofílica. Sendo assim, o leve aumento inicial da condutividade está relacionado à maior mobilidade dos íons presentes na fase contínua causada pelo aquecimento. Já o decréscimo repentino da condutividade refere-se ao processo de inversão de fases, no qual o conteúdo oleoso torna-se a fase contínua, diminuindo, portanto a condução elétrica do sistema (Fernandez *et al.*, 2004).

No presente estudo, a inversão de fases das nanoemulsões ocorreu em torno de $73,317 \pm 1,741^\circ\text{C}$. Este valor garante a viabilidade de obtenção das nanoemulsões O/A, visto que, para esse processo as fases aquosa e oleosa são aquecidas, inicialmente, a 75°C , temperatura superior as que foram responsáveis pela redução da condutividade elétrica e consequente instabilidade do sistema.

5.3.2.5. Determinação do tamanho de partícula

Diversos fatores podem influenciar o grau de distribuição e o diâmetro médio de gotícula de nanoemulsões, em especial, a seleção de componentes, como os tensoativos e os óleos, a composição quantitativa das formulações e as condições experimentais utilizadas nas técnicas de preparação (Bouchemal *et al.*, 2004; Benita, 1999).

Se o tamanho das partículas se situar entre 50 a 500 nm, estas são denominadas de nanoemulsão, sendo assim, como a formulação apresentou partículas com tamanho em torno de $76,857 \pm 3,186$ nm, esta pode ser caracterizada como tal (Tabela 15) (Pianovski *et al.*, 2008).

Tabela 15: Valores das replicatas da determinação do tamanho da partícula da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Nanoemulsão	Tamanho das partícula (nm)	Índice de Polidispersão (IP)
A	77,94	0,094
B	79,36	0,093
C	73,27	0,085
Média	$76,857 \pm 3,186$	$0,091 \pm 0,005$

A distribuição de tamanho das partículas pode apresentar-se como sendo monodispersa ou polidispersa, contendo uma distribuição de tamanhos estreita ou larga, respectivamente. Uma vez definida uma escala compreendida entre 0 e 1, considera-se um "bom" índice de polidispersão (IP) aquele que apresenta um valor inferior a 0,1, representando uma população de partículas com elevada homogeneidade (Gaumet *et al.*,

2008). Com isso, pode-se concluir que a formulação é monodispersa (Figura 12), visto que o valor do IP foi de $0,091 \pm 0,005$.

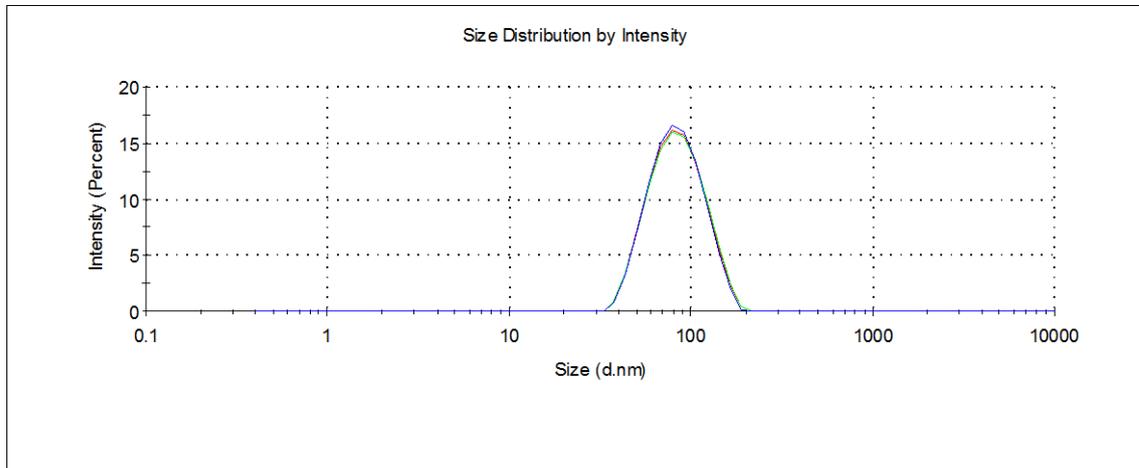


Figura 12: Representação gráfica da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

5.3.2.6. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta reflete a composição da interface das nanoemulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A magnitude desse potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão considerando que, se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo desse potencial, elas irão se repelir evitando a agregação. No caso de valores de potencial zeta próximos à zero, a ausência de carga superficial pode favorecer, em alguns casos, interações entre partículas o que promove processos de floculação ou agregação. De forma geral, a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis é considerada como sendo o valor de potencial zeta de ± 30 mV (Martini, 2005; Roland *et al.*, 2003).

Tabela 16: Valores das replicatas do potencial zeta da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Nanoemulsão	Potencial Zeta (mV)
A	-5,57
B	-12,40
C	-8,54
Média	-8,985 \pm 4,83

Sendo assim, os valores do potencial zeta foram em média $-8,985 \pm 4,83$ mV. De acordo com Fronza, Campos & Teixeira (2004), esta propriedade pode ser significativamente reduzida em pH ácidos, como o encontrado para a nossa formulação, o que justificaria o baixo valor em módulo para esta análise. No entanto, apesar do potencial zeta não estar na faixa do que seria ideal, a nanoemulsão apresentou uma certa carga (Figura 13) que já foi suficiente para torná-la estável. Este fato pôde ser observado devido a estabilização estérica e eletrostática apresentada pelas dispersões coloidais. A estabilização eletrostática ocorre devido às forças de repulsão entre as partículas, uma vez que, por apresentarem a mesma constituição e conseqüentemente cargas superficiais semelhantes, tendem a promover uma maior estabilidade frente às forças de atração. Já a estabilização estérica é observada pela dificuldade de deformação dos glóbulos devido ao seu tamanho reduzido e, por conseguinte, diminuição dos efeitos da coalescência e floculação. Além disso, a espessura do filme interfacial dessas partículas, em relação ao tamanho dos glóbulos, dificulta o rompimento destes diante de uma redução natural do filme. Por fim, a presença do movimento browniano nessas formulações superam os efeitos da força da gravidade atuantes nas partículas, diminuindo fenômenos de instabilidade como cremação e sedimentação. (Fernandez *et al.*, 2004; Tadros *et al.*, 2004; Capek, 2002).

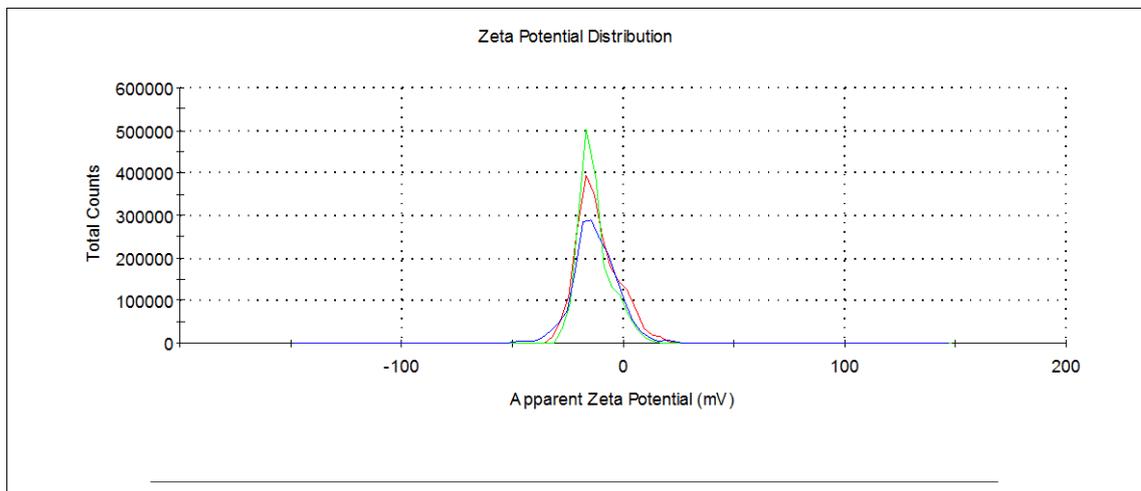


Figura 13: Representação gráfica do potencial zeta da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

5.3.2.7. Determinação do comportamento reológico

O comportamento reológico das formulações foi avaliado utilizando a Lei das Potências, dada pela fórmula:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Equação 5}$$

Onde, τ é a tensão de cisalhamento, k é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento e n é o índice de fluxo.

Tabela 17: Parâmetros do comportamento reológico da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* de acordo com o período analisado.

Período	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo	Nível de confiança (%)
24 horas	4,00	0,94	91,7
7 dias	2,41	1,04	93,7
14 dias	2,32	1,02	98,6
Média	2,910 ± 0,945	1,00 ± 0,053	94,667 ± 3,550

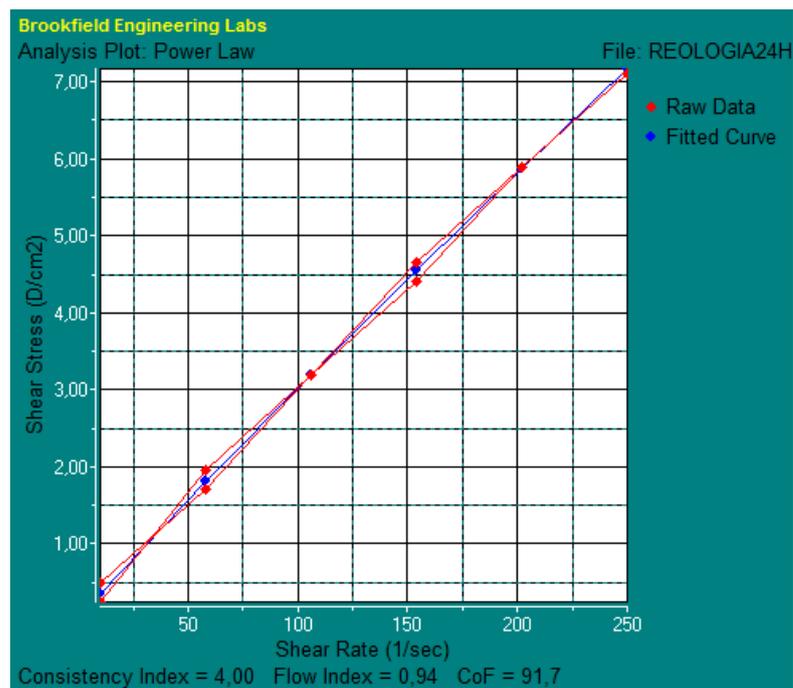


Figura 14: Representação gráfica do comportamento reológico da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Segundo o modelo da Lei da Potência, dado pela equação 5, quando o índice de fluxo (n) for igual a 1, o fluido é newtoniano e o valor do índice de consistência (k) fornece a viscosidade. Ao observar a tabela 17, nota-se que para cada período a formulação apresentou um índice de fluxo bem próximo a 1, sendo que a média desses

valores é $n = 1$, o que define a nanoemulsão com um comportamento do tipo newtoniano. Um fluido newtoniano caracteriza-se por possuir viscosidade absoluta constante, independentemente da variação da taxa de deformação, conforme demonstrado na figura 14, em que a relação entre a tensão de cisalhamento (*Shear Stress*) e a taxa de cisalhamento (*Shear rate*) é linear. Isso significa que para uma dada temperatura, a viscosidade permaneceu constante durante sua medição, independentemente do tempo e da taxa de cisalhamento empregada (Costa, 2007).

Os valores para viscosidade, aqui representados pelo índice de consistência (k), foram equivalentes a $2,910 \pm 0,945$ cP, revelando um baixo índice, o que já era esperado devido ao tamanho reduzido das partículas da nanoemulsão.

A viscosidade de nanoemulsões líquidas apresenta geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano, sendo que a viscosidade é principalmente influenciada pela concentração de óleo da fase interna e pelo diâmetro de gotícula das formulações (Martini, 2005; Silvander *et al.*, 2003).

Estudos do comportamento reológico pode contribuir para a avaliação da influência que os processos de fabricação exercem na preparação das formulações, bem como otimizar o desenvolvimento de novos produtos. A viscosidade é uma variável que caracteriza reologicamente um sistema e auxilia a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada, podendo indicar se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (Silva *et al.*, 2006; Brasil, 2004).

5.3.2.8. Ensaio de estabilidade acelerada

a) Estresse térmico

Os estudos de estabilidade procuram fornecer dados que revelem o grau de estabilidade relativa de um produto nas diferentes condições de exposição a que possa estar submetido, em determinado intervalo de tempo, desde a fabricação até o encerramento de seu prazo de validade (Brasil, 2004). Assim sendo, as informações obtidas com esses estudos são relevantes para os veículos emulsionados, pois quando estocados podem fornecer sinais de desestabilização como: (1) cremação ou sedimentação, causada pela diferença na densidade entre as duas fases, em que a

influência da força gravitacional causa a separação das fases; (2) floculação ou agregação, devido a energia de interação (forças atrativas, como do tipo Van der Waals, e repulsivas) entre duas partículas em função da distância e (3) coalescência, resultado da fusão dos glóbulos. A presença desses fenômenos leva a separação de fases e a inativação de substâncias ativas e, conseqüentemente, ineficácia do sistema (Tadros *et al.*, 2004; Idson, 1993). Em acréscimo, a análise do perfil de distribuição do tamanho das partículas, durante o período de estabilidade, permite acompanhar o comportamento microscópico das partículas em suspensão evidenciando fenômenos de instabilidade.

Tabela 18: Valores da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* após a submissão ao estresse térmico de acordo com o período analisado.

Período	Tamanho das partícula (nm)	Índice de Polidispersão (IP)
Inicial	65,933 ± 0,850	0,186 ± 0,080
24 horas	63,700 ± 0,566	0,150 ± 0,019
7 dias	69,700 ± 10,607	0,185 ± 0,085
14 dias	63,600 ± 0,141	0,154 ± 0,023
21 dias	66,250 ± 4,031	0,169 ± 0,062
28 dias	65,600 ± 2,828	0,162 ± 0,027

A tabela 18 representa a distribuição do tamanho das partículas das nanoemulsões submetidas ao processo de estresse térmico de acordo com o período. Os resultados demonstram a manutenção do diâmetro médio de partícula, visto que não houve diferença estatística para $p < 0,05$. Além disso, a formulação foi estável, pois não apresentou separação de fases para nenhuma das temperaturas testadas.

A temperatura é um exemplo de fator extrínseco que pode influenciar na estabilidade de um produto, indicando a não conformidade no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto (Brasil, 2004). Como resultado de sua instabilidade termodinâmica, as emulsões tendem a sofrer uma redução na sua energia livre total através do aumento do diâmetro de gotícula, com redução de sua área interfacial total (Tadros *et al.*, 2004).

Segundo Aulton (2005), o aumento da temperatura acelera reações físico-químicas e químicas que podem favorecer tanto o processo de cremeação quanto de coalescência, devido à diminuição da viscosidade da fase contínua, bem como, ao

aumento da motilidade cinética da fase dispersa e do tensoativo, além de proporcionar alterações na atividade de componentes, aspecto, cor e odor do produto.

b) Centrifugação

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força da gravidade, elevando a mobilidade das partículas e antecipando possível instabilidade. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras (Brasil, 2004).

Tabela 19: Valores da distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* após a submissão a centrifugação de acordo com o período analisado.

Período	Tamanho das partícula (nm)	Índice de Polidispersão (IP)
Inicial	65,933 ± 0,850	0,186 ± 0,080
24 horas	65,750 ± 0,778	0,180 ± 0,013
7 dias	66,150 ± 0,071	0,141 ± 0,041
14 dias	66,550 ± 1,485	0,222 ± 0,017
21 dias	65,500 ± 0,424	0,191 ± 0,014
28 dias	66,600 ± 1,131	0,137 ± 0,016

A tabela 19 representa a distribuição do tamanho das partículas das nanoemulsões submetidas ao processo de centrifugação de acordo com o período. Os resultados demonstram a manutenção do diâmetro médio de partícula, visto que não houve diferença estatística para $p < 0,05$. Além disso, a formulação foi estável, pois não apresentou separação de fases para nenhuma das rotações testadas.

Segundo Masson e colaboradores (2005), o tempo de validade de um produto em condições normais de estocagem pode ser rapidamente previsto pela observação da separação da fase dispersa devido à cremação ou coalescência quando a emulsão é submetida à centrifugação. Portanto, a avaliação da estabilidade é considerada um procedimento preditivo, os resultados não são absolutos, mas representam uma probabilidade de sucesso, baseando-se em informações obtidas de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado (Brasil, 2004).

5.4. Atividade antimicrobiana

5.4.1. Atividade antimicrobiana qualitativa

A figura 15 ilustra um exemplar dos halos de inibição formados pelo óleo essencial para cada microrganismo testado e a tabela 20 mostra a média do tamanho desses halos, que para melhor visualização foi reproduzido na figura 16.

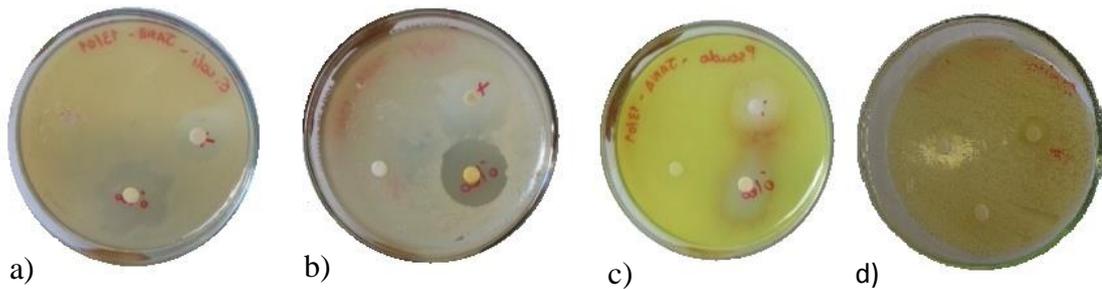


Figura 15: Halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* sobre os microrganismos a) *Escherichia coli* ATCC25922, b) *Staphylococcus aureus* ATCC25923, c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e d) *Candida albicans* ATCC14408.

Tabela 20: Tamanho dos halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* sobre os microrganismos *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Candida albicans* ATCC14408.

Microrganismo	Tamanho do halo de inibição (mm)		
	Controle Negativo*	Controle Positivo	Óleo Essencial
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	22,00 ± 2,650	19,67 ± 2,520
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	30,00 ± 2,000	23,00 ± 1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	21,67 ± 3,060	15,67 ± 4,620
<i>Candida albicans</i> ATCC14408	-	20,33 ± 2,520	15,33 ± 4,160

* Não apresentou formação do halo de inibição.

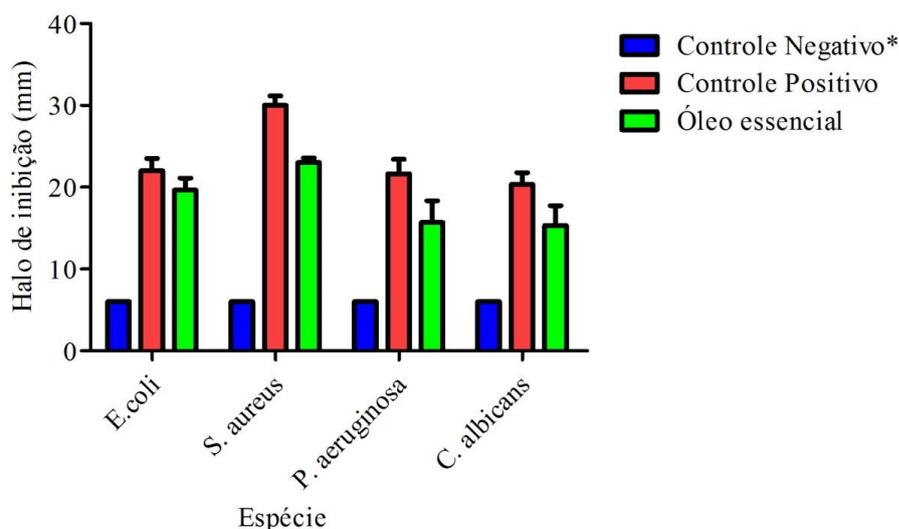


Figura 16: Tamanho dos halos de inibição formados na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* sobre os microrganismos *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Candida albicans* ATCC14408.* Não apresentou formação do halo de inibição, 6 mm refere-se ao tamanho do disco utilizado no teste.

Observa-se que o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* apresentou efetividade de inibição para as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e para o fungo *C. albicans*, caracterizado pela formação de halos de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm.

Os resultados obtidos neste estudo considerando o óleo essencial de *C. densiflorus* encontram-se compatíveis com os obtidos por Takaisi-Kikuni, Tshilanda e Babady (2000). Tal pesquisa demonstrou que o óleo essencial de *C. densiflorus* apresentou um potencial antimicrobiano de amplo espectro, sendo as bactérias Gram-positivas mais sensíveis do que as Gram-negativas. Os microrganismos utilizados foram: *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* e *Klebsiella pneumoniae*.

Estudos com outra espécie de *Cymbopogon*, *C. citratus*, e de seus três componentes majoritários, revelaram que o α e β -citral apresentam isoladamente efeitos contra as espécies *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*. O terceiro constituinte, o mirceno, não demonstrou nenhuma ação antibacteriana quando isolado, no entanto, quando avaliado conjuntamente com outras substâncias foi possível observar um aumento desta atividade

(Onawunmia, Yisak & Ogunlana, 1984). Ademais, a partir de uma avaliação do óleo essencial desta espécie feita por Pereira e colaboradores (2004) foi possível concluir também que o mesmo expressa um efeito bactericida satisfatório sobre as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Morganella morganii* e *Enterobacter aerogenes*. No entanto, o mesmo não pôde ser inferido para as espécies *Klebsiella oxytoca* e *P. aeruginosa*, embora este último microrganismo tenha se mostrado sensível para o óleo de *C. densiflorus*. Por fim, de acordo com Heyder e Silva (2004), o óleo volátil de *C. citratus*, bem como, seu extrato hidroalcoólico 50% também apresentaram atividade inibitória sobre espécies de fungos, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*.

Os produtos mais suscetíveis à contaminação são os que apresentam água em sua formulação como as emulsões. Ao demonstrar ações antimicrobianas para diferentes classes de microrganismos, este óleo essencial caracteriza-se por ser um conservante inerente ao produto, elevando a qualidade da conservação das formulações. Caso este, diferentemente observado para o controle da nanoemulsão (sem óleo essencial), o qual apresentou, após algumas semanas de sua obtenção, o aparecimento de colônias escuras, características de fungos.

5.4.2. Atividade antimicrobiana quantitativa

A partir da avaliação da atividade antimicrobiana quantitativa foi possível determinar a concentração mínima (CIM) do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* e de sua forma nanoemulsionada capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados.

Tabela 21: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e da nanoemulsão com óleo essencial sobre os microrganismos *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Candida albicans* ATCC14408.

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{L/mL}$)	
	Óleo Essencial	Nanoemulsão
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	3,906	31,250 (1,562)*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	7,812	62,500 (3,125)*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	15,625	125,000 (6,250)*
<i>Candida albicans</i> ATCC14408	0,488	15,625 (0,781)*

* Concentração de óleo essencial presente na nanoemulsão.

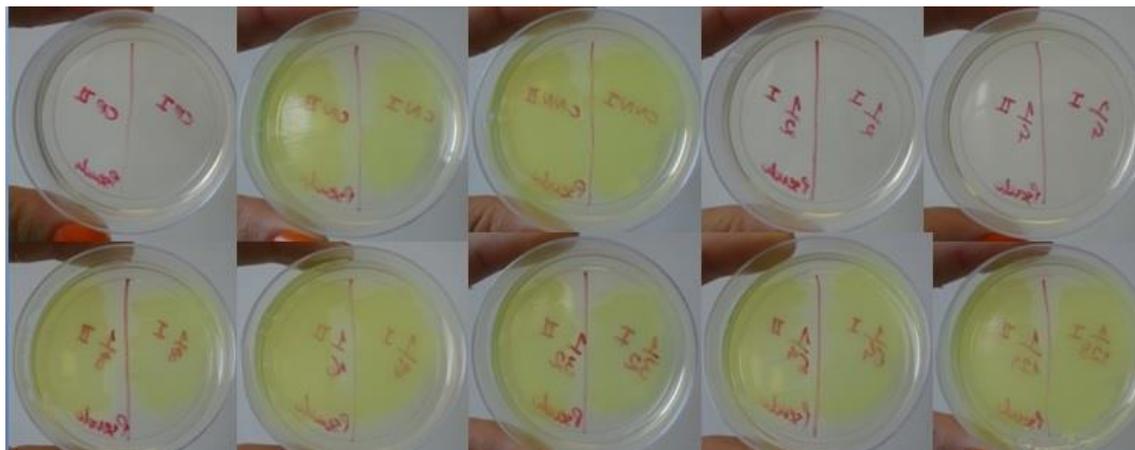


Figura 17: Demonstração ilustrativa do crescimento bacteriano nos controles e amostras para determinação da concentração inibitória mínima.

O efeito bactericida sobre as espécies *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi, respectivamente, aparente nas concentrações de 3,906; 7,812; 15,625 e 0,488 $\mu\text{L/mL}$ para o óleo essencial e 31,25; 62,5; 125,0 e 15,625 $\mu\text{L/mL}$ para a nanoemulsão.

Em adição, foi possível observar que a nanoemulsão mostrou o mais destacável resultado, visto que as CIM do óleo formulado foram, respectivamente, de 1,562; 3,125 e 6,250 $\mu\text{L/mL}$ quando testados sobre as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, valores estes inferiores frente ao óleo puro. Embora o mesmo não tenha sido observado para o fungo *C. albicans*, o valor da CIM de 0,781 $\mu\text{L/mL}$ do óleo formulado também foi satisfatório.

Segundo Takaisi-Kikuni, Tshilanda e Babady (2000), os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) para o óleo essencial de *C. densiflorus* revelaram valores entre 250 e 500 ppm para bactérias Gram-positivas, mais sensíveis, e entre 500 e 1000 ppm para Gram-negativas. Baseando-se na organização estrutural, as espécies Gram-negativas possuem uma parede bacteriana diferenciada, caracterizada por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), a qual confere maior resistência por evitar a difusão e acúmulo de óleo essencial na célula bacteriana (Probst, 2012).

Chagas e colaboradores (2002) ao demonstrarem a ação biocida de espécies de *Eucalyptus* sobre o carrapato *Boophilus microplus*, observaram que os óleos essenciais tiveram suas atividades potencializadas quando transformados em concentrados

emulsionáveis. A absorção de um bioativo pode ocorrer de duas maneiras, sendo assim, é aconselhável que este seja anfifílico para ser absorvido. O óleo essencial puro encontra-se muito concentrado, o que propicia a ocorrência do fenômeno físico conhecido como apassivação, em que, inicialmente, o produto é absorvido e, posteriormente, é formado um filme que impede a passagem do óleo. No entanto, quando este se apresenta mais diluído, esta barreira não é formada e o óleo passa a penetrar mais lentamente, porém de uma forma mais efetiva. Com isso, o óleo puro é apenas lipofílico e possui uma absorção menor, enquanto que o sistema emulsionável apresenta uma fase lipofílica e outra hidrofílica equilibradas por tensoativos. A redução do tamanho das gotículas de óleo e a alteração das forças entre as moléculas da água provocadas pelos tensoativos possibilitam que os monoterpenos penetrem da maneira mais fácil na água e formem, assim, as emulsões. Portanto, a formulação tem um potencial de ação aumentado devido ao reduzido tamanho das partículas, bem como, a uma maior biodisponibilidade para penetrar e agir, o que justifica a redução da concentração do óleo formulado para reproduzir a mesma atividade apresentada pelo óleo puro (Chagas *et al.*, 2002).

Com isso, foi possível observar que óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* e sua forma nanoemulsionada possuem um alto potencial antibiótico, sendo, portanto, uma possibilidade real de aplicação deste produto para o tratamento de doenças ocasionadas pelas bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e pelo fungo *C. albicans*. No entanto, é necessário ressaltar que testes para avaliação da toxicologia e estudos clínicos devem ser realizados como auxílio na segurança do uso deste produto como fármacos.

5.5. Atividade antioxidante

Os gráficos da figura 18 a 21 representam a porcentagem de inibição da oxidação do radical DPPH pela concentração das amostras.

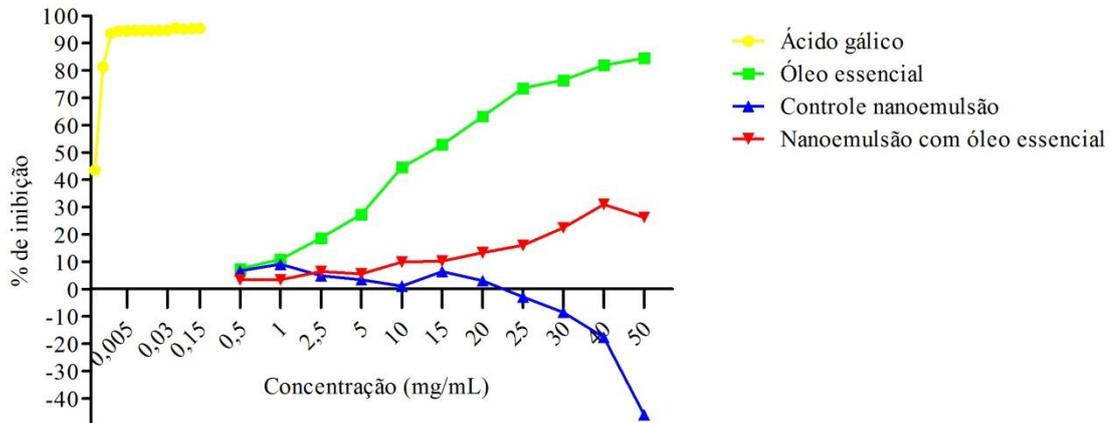


Figura 18: Avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*, nanoemulsão com óleo essencial e controle da nanoemulsão.

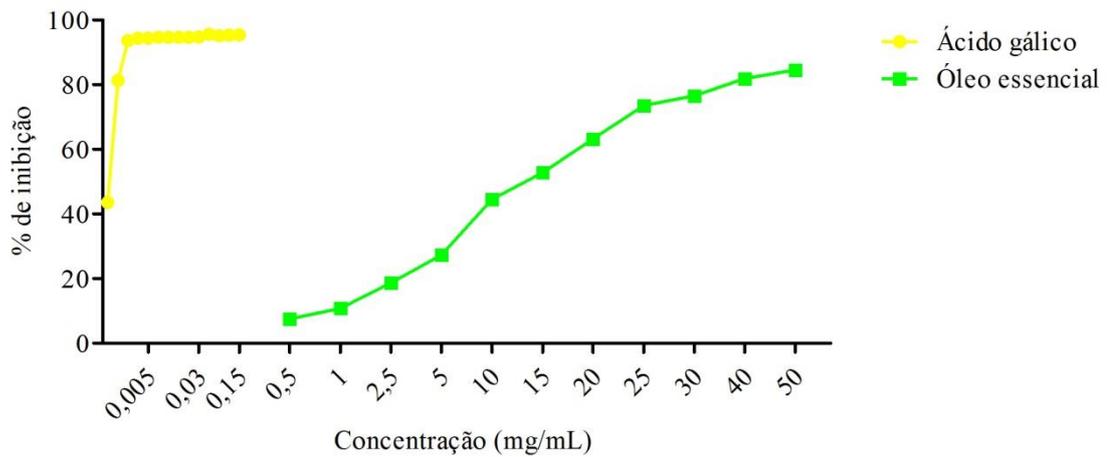


Figura 19: Avaliação da atividade antioxidante do padrão ácido gálico e óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

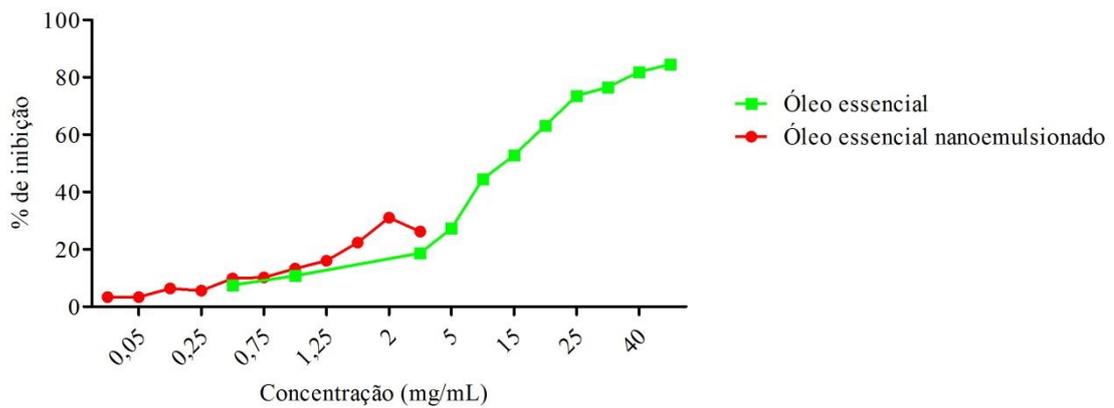


Figura 20: Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial puro de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e sua concentração na forma nanoemulsionada.

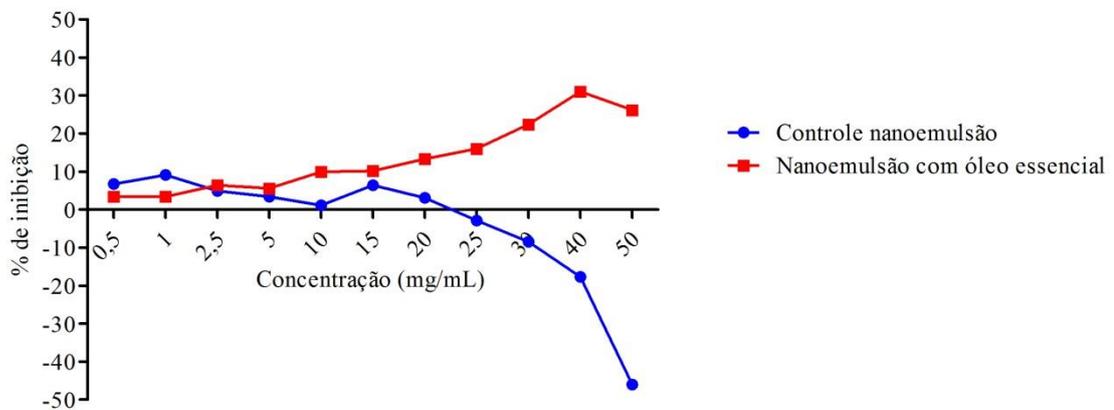


Figura 21: Avaliação da atividade antioxidante da nanoemulsão com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e de seu controle sem o óleo essencial.

O cálculo da regressão linear para cada amostra gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R^2) conforme a tabela 22.

Tabela 22: Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da atividade antioxidante para o padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e nanoemulsão com óleo essencial.

Amostra	Equação correspondente a faixa de linearidade	R^2
Ácido gálico	$y = 25050x + 22,7$	$R^2 = 0,9205$
Óleo essencial	$y = 2,6405x + 11,212$	$R^2 = 0,9746$
Nanoemulsão com óleo essencial	$y = 0,642x + 2,5942$	$R^2 = 0,9590$

O potencial antioxidante foi quantificado a partir da determinação da concentração capaz de reduzir a 50% a quantidade inicial de DPPH ($CI_{50\%}$), em que o ácido gálico, o óleo essencial e a nanoemulsão apresentaram valores de $CI_{50\%}$ equivalentes a $1,09 \times 10^{-3}$, 14,689 e 73,840 mg/mL, respectivamente. Visto que a

formulação contém 5% do óleo essencial, o valor da $CI_{50\%}$ do mesmo quando formulado é 3,692 mg/mL (Tabela 23). O controle da formulação não apresentou atividade.

Tabela 23: Determinação da $CI_{50\%}$ da atividade antioxidante para o padrão ácido gálico, óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e nanoemulsão com óleo essencial.

Amostra	$CI_{50\%}$ (mg/mL)
Ácido gálico	$1,09 \times 10^{-3}$
Óleo essencial	14,689
Nanoemulsão com óleo essencial	73,840 (3,692)*

* Concentração de óleo essencial presente na nanoemulsão.

Pode-se observar que as concentrações do óleo essencial e da nanoemulsão foram maiores para reproduzirem o mesmo efeito do padrão do ácido gálico. Além disso, foi possível confirmar que o controle da nanoemulsão (sem óleo essencial) não apresentou atividade antioxidante.

Sabe-se que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante. No entanto, como os óleos essenciais possuem baixas concentrações desses compostos, visto que, são constituídos, principalmente, por terpenos, isto justifica a necessidade de altas proporções dos mesmos para revelarem um potencial antioxidante (Sousa *et al.*, 2007). Entretanto, a forma nanoemulsionada do óleo foi capaz de reproduzir a atividade biológica a partir de menores concentrações do mesmo.

Estudos da atividade antioxidante para o óleo essencial de três espécies de *Cymbopogon*, *C. citratus*, *C. giganteus* e *C. proximus*, a partir da metodologia do sequestro do radical livre DPPH, revelaram um baixo potencial quando comparados com o t-butilhidroxitolueno e δ -tocoferol, antioxidantes utilizados comercialmente. Sendo assim, nenhuma dessas amostras demonstra ser suficientemente interessante para uma aplicação industrial neste campo (Menut *et al.*, 2000).

5.6. Atividade alelopática

Os gráficos abaixo exibem a concentração do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e da nanoemulsão pela porcentagem de inibição da germinação (a) e do crescimento da raiz (b) sobre as espécies de alface (Figura 22), pepino (Figura 23) e tomate (Figura 24).

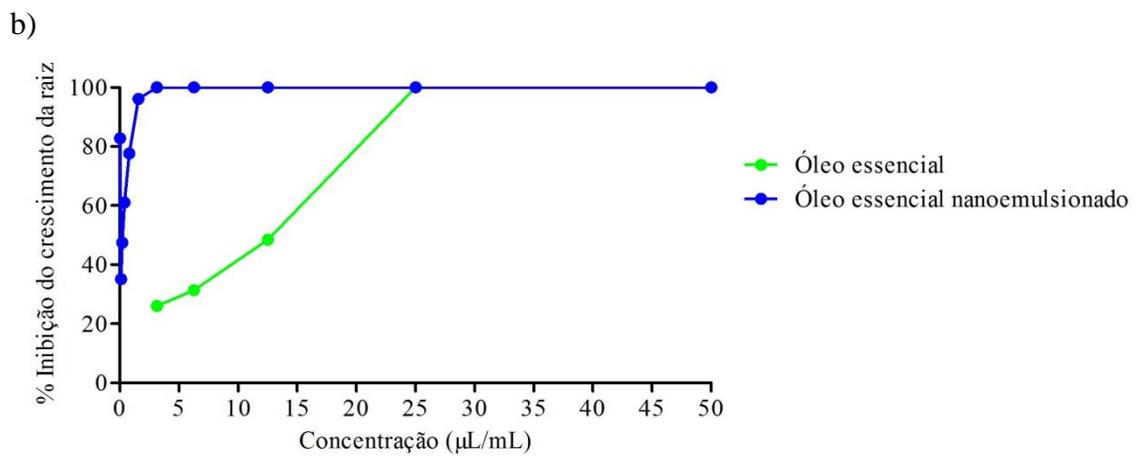
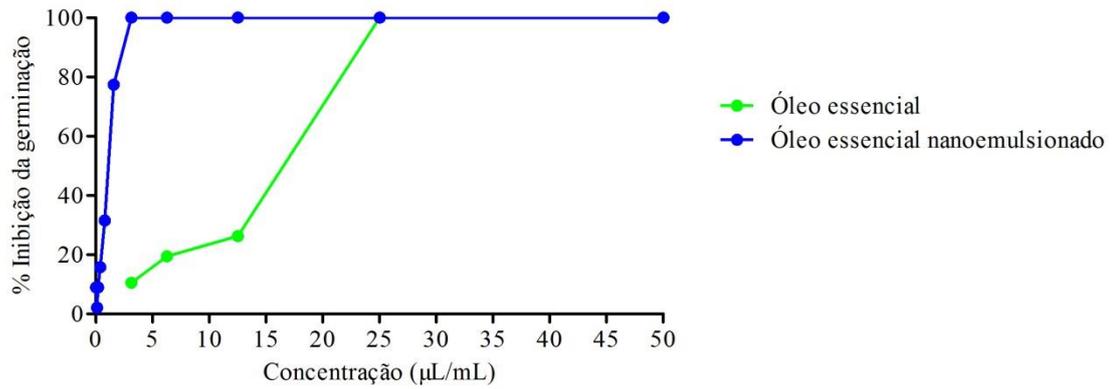
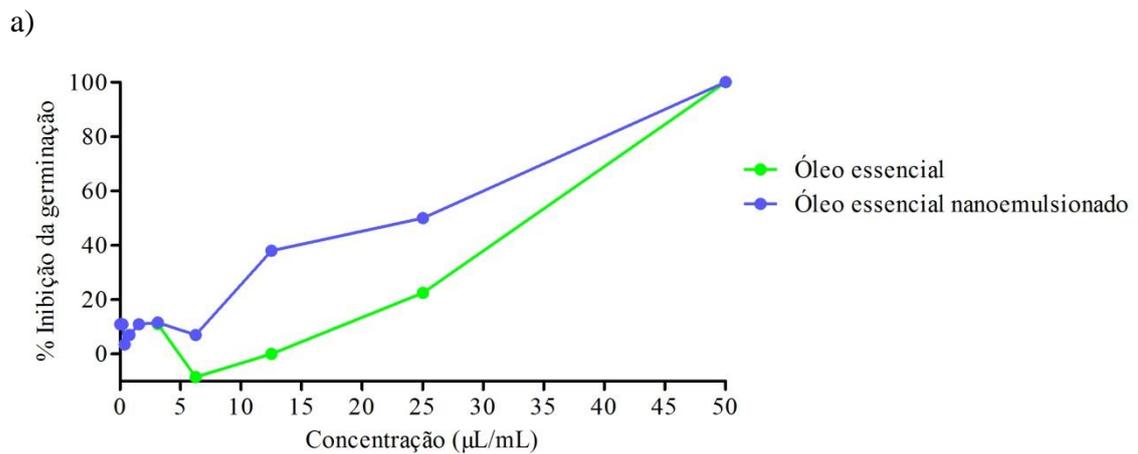


Figura 22: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.



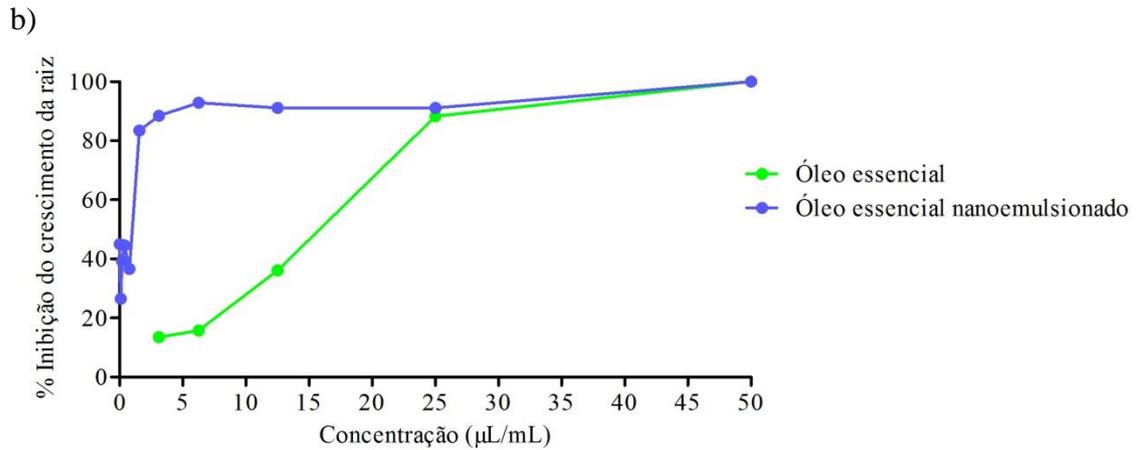


Figura 23: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de pepino (*Cucumis sativus*). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.

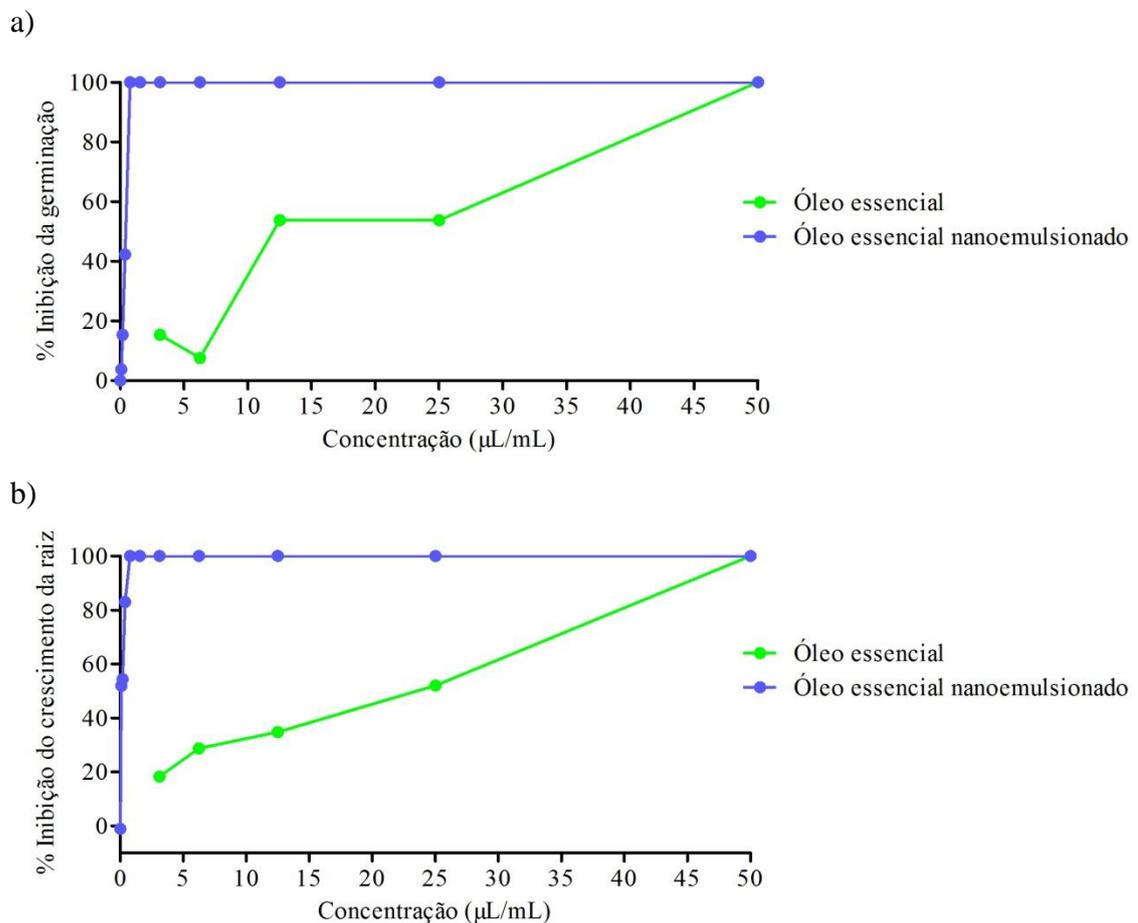


Figura 24: Atividade alelopática do óleo essencial puro de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e sua forma nanoemulsionada sobre sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*). a) % de inibição da germinação. b) % de inibição do crescimento da raiz.

O cálculo da regressão linear para cada amostra gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R^2) conforme a tabela 24.

Tabela 24: Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da porcentagem de inibição da germinação e porcentagem de inibição do crescimento da raiz para o óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e nanoemulsão com óleo essencial sobre sementes de alface, pepino e tomate.

Semente		Equação correspondente à faixa de linearidade	
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)			
% de inibição da germinação	Óleo essencial	$y = 4,1017x - 8,9861$	$R^2 = 0,9311$
	Nanoemulsão	$y = 33,013x + 6,0497$	$R^2 = 0,9376$
% de inibição do crescimento da raiz	Óleo essencial	$y = 3,4574x + 10,936$	$R^2 = 0,9825$
	Nanoemulsão	$y = 38,888x + 40,061$	$R^2 = 0,9241$
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)			
% de inibição da germinação	Óleo essencial	$y = 2,5263x - 30,705$	$R^2 = 0,9781$
	Nanoemulsão	$y = 1,9063x + 4,7662$	$R^2 = 0,9738$
% de inibição do crescimento da raiz	Óleo essencial	$y = 3,5523x - 3,1941$	$R^2 = 0,9794$
	Nanoemulsão	$y = 35,578x + 28,65$	$R^2 = 0,9729$
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)			
% de inibição da germinação	Óleo essencial	$y = 1,9454x + 3,1565$	$R^2 = 0,9812$
	Nanoemulsão	$y = 132,56x - 6,158$	$R^2 = 0,9892$
% de inibição do crescimento da raiz	Óleo essencial	$y = 1,6797x + 14,229$	$R^2 = 0,9907$
	Nanoemulsão	$y = 73,49x + 45,67$	$R^2 = 0,9314$

Tabela 25: Determinação da $CI_{50\%}$ da germinação e do crescimento da raiz para o óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e nanoemulsão com óleo essencial sobre sementes de alface, pepino e tomate.

Semente	$CI_{50\%}$ ($\mu\text{L/mL}$)			
	Germinação		Crescimento da raiz	
	Óleo essencial	Nanoemulsão	Óleo essencial	Nanoemulsão
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	14,38	26,60 (1,33)*	11,29	5,00 (0,25)*
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	31,94	474,40 (23,72)*	14,97	12,00 (0,60)*
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	24,07	8,40 (0,42)*	21,29	1,00 (0,05)*

* Concentração de óleo essencial presente na nanoemulsão.

Considera-se a inibição mínima de 50% da germinação e crescimento da raiz como um nível satisfatório para refletir a potencialidade de uma planta como fornecedora de compostos com atividade alelopática. No presente trabalho, o nível da $CI_{50\%}$ da germinação foi atingido, respectivamente, para o óleo puro e para a

nanoemulsão nas concentrações de 14,38 e 26,60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para alface, 31,94 e 474,40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para pepino e 24,07 e 8,40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para tomate, e os valores da $\text{CI}_{50\%}$ do crescimento da raiz foram 11,29 e 5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para alface, 14,97 e 12,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para pepino e 21,29 e 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para tomate. Visto que a formulação contém 5% do óleo essencial, os valores da $\text{CI}_{50\%}$ da germinação e do crescimento da raiz do mesmo quando formulado é 1,33 e 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para alface, 23,72 e 0,60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para pepino e 0,42 e 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para tomate (Tabela 25).

É de conhecimento que tecidos adultos geralmente possuem menor taxa biossintética de metabólitos quando comparados a tecidos mais novos, sendo que, frequentemente há uma correlação inversa entre alta atividade metabólica e produção de aleloquímicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Este fato justificaria o alto potencial alelopático revelado pelo óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, a qual foi coletada com tamanho indicativo de maior maturidade.

Ademais, o grau de inibição proporcionado por determinado aleloquímico é dependente do limite de resposta da espécie receptora, o qual não é constante e está intimamente relacionado à sensibilidade da espécie receptora, bem como, da sua concentração, ao passo que, em baixas concentrações, os aleloquímicos podem não ser inibitórios para determinadas espécies ou até mesmo apresentar efeitos estimulatórios, por outro lado, altas concentrações podem ser extremamente inibitórias. Porém, os mecanismos pelos quais essas fitotoxinas atuam ainda não estão totalmente elucidados, devido a limitada disponibilidade de trabalhos que abordam esta questão e a seletividade expressa pelos aleloquímicos em suas ações e as plantas em suas respostas, mas de uma maneira geral, sabe-se que essas substâncias interferem nas atividades vitais das plantas, como, fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes, síntese de proteínas, atividades enzimáticas, permeabilidade da plasmalema e, por fim, no desenvolvimento da planta (Pires & Oliveira, 2011; Rice, 1984; Harper & Balke, 1981).

Estudos do efeito alelopático das substâncias voláteis de *C. citatrus* sobre sementes de milho (*Zea mays*) e capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) revelaram que a taxa de germinação não apresentou diferença considerável quando comparada com o controle negativo, no entanto, o crescimento de plântulas foi significativamente inibido. Essas substâncias constituíam-se de terpenos, principalmente monoterpenos e

sesquiterpenos (Li *et al.*, 2005). Em adição, Dudai e colaboradores (1999) ao estudar o potencial alelopático do óleo essencial de três espécies, *Origanum syriacum*, *Micrometria fruticosa* e *Cymbopogon citratus* sobre sementes de trigo, encontrou valores de $CI_{50\%}$ de 16 e 32 nL/mL, respectivamente para o crescimento da raiz e germinação, no caso do capim limão (*C. citratus*), confirmando seu potencial para esta propriedade.

Pesquisas da fitotoxicidade do citronelal, monoterpene oxigenado presente em várias espécies do gênero *Cymbopogon*, sobre algumas sementes de ervas daninhas, *Ageratum conyzoides* L., *Chenopodium album* L., *Parthenium hysterophorus* L., *Malvastrum coromandelianum* L. Garcke, *Cassia occidentalis* L. e *Phalaris minor* Retz., revelaram um efeito significativo sobre a germinação e o crescimento inicial da plântula. A falha no crescimento da raiz foi atribuída ao efeito do citronelal sobre a atividade mitótica. Além disso, foi possível observar uma lesão visível causada sob a forma de clerose e necrose, levando ao emurchecimento e até mesmo a morte das ervas daninhas. Houve perda de clorofila e redução na respiração celular indicando comprometimento do metabolismo fotossintético e respiratório (Singh *et al.*, 2006).

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

O teor médio de óleo essencial obtido das folhas de *Cymbopogon densiflorus* foi de aproximadamente 0,09%. A técnica de CG/EM proporcionou a identificação de mais de 90% da constituição química do óleo essencial, a qual é formada principalmente por monoterpenos.

A partir do estudo da sazonalidade, pôde-se observar que menos de 10% da caracterização deste óleo, considerando as seis épocas de colheita, foram distintas. Além disso, os compostos majoritários, *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, predominaram no decorrer do ano.

O procedimento de emulsificação por inversão de fases mostrou-se eficaz à obtenção de nanoemulsões com diâmetro de gotícula inferior a 100 nm e, por meio da caracterização destas, foi possível a confirmação da produção de uma formulação estável.

Este óleo, assim como, a nanoemulsão apresentaram uma notável inibição da multiplicação microbiana para as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e para o fungo *C. albicans*. Os resultados obtidos indicam, então, a possibilidade de aplicá-los no desenvolvimento de alternativas para terapia de amplo espectro antimicrobiano.

A concentração de óleo essencial contida na nanoemulsão para revelar uma redução a 50% da quantidade inicial de radicais livres de DPPH foi quatro vezes inferior quando comparada com o óleo em sua forma livre.

Para finalizar, foi possível determinar pela primeira vez o alto potencial alelopático deste óleo sobre as espécies de alface, pepino e tomate e o aumento da sua atividade quando formulado. Esta propriedade pode ser atribuída à presença de monoterpenos, constituintes majoritários do óleo.

Sendo assim, esses estudos demonstraram um alto desempenho das propriedades alelopáticas e antimicrobianas do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e a viabilidade de preparar nanoemulsões contendo este óleo, as quais foram capazes de manter ou até mesmo aumentar a expressão das atividades biológicas. Este produto, portanto, poderia auxiliar a produção agrícola a fim de combater fitopatologias, além da possibilidade de sua utilização na medicina no combate de infecções e micotoxidades.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

- Abismail, B.; Canselier, J. P.; Wilhelm, A. M.; Delmas, H.; Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem*, v. 6, p. 75-83.
- Adams, R. P. (1989). Identification of essential oils ion trap mass spectroscopy. San Diego: Academic Press Inc.
- Akhila, A. (2010). Essential oil-bearing grasses: The genus *Cymbopogon*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles, v. 46.
- Andrade, C. A.; Costa, C. K.; Bora, K.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. & Kerber, V. A. (2007) Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 231-235.
- Araujo, O.; Giudici, R.; Saldivar, E. & Ray, W. H. (2001). Modeling and experimental studies of emulsion copolymerization systems. I. Experimental results. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 79, n. 13, p. 2360-2379.
- Araújo Filho, R. (2000). Introdução à pecuária ecológica: a arte de criar animais sem drogas ou venenos. Porto Alegre: São José, p. 136.
- Aulton, M. E. (2005). Delineamento de formas farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2ª edição, p. 677.
- Barbosa, L. C. S. (2007). Morfo-anatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae). Universidade Federal de Goiás.
- Becher, P. (2001). Emulsions: Theory and practice. Oxford: Oxford University Press.
- Belinelo, V. J.; Czepak, M. P.; Vieira Filho, S. A.; Menezes, L. F. T. & Jamal, C. M. (2008). Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. *Revista Caatinga, Mossoró - Brasil*, v. 21, n. 4, p. 12-16.
- Benita, S. (1999). Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 53, p. 193-206.
- Bernardi, D. S. (2011). Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase. Riberão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, USP, p. 104.
- Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C. & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594.
- Borella, J. C.; Duarte, D. P.; Novaretti, A. A. G.; Menezes Jr., A.; França, S. C.; Rufato, C. B.; Santos, P. A. S.; Veneziani, R. C. S. & Lopes, N. P. (2006). Variabilidade

- sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 557-561.
- Bouchemal, K.; Briançon, S. Perrier, E. & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251.
- Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S. & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, v. 161, p. 839-851.
- Brasil. (2004). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, v. 1, p. 45.
- Buchli, L. (2002). Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, n. 2, p. 54-57.
- Bulbovas, P.; Rinaldi, M. C. S.; Delitti, W. B. C. & Domingos, M. (2005). Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, n. 4, p. 687-696.
- Capek, I. (2002). Sterically and electrosterically stabilized emulsion polymerization: Kinetics and preparation. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 99, p. 77-162.
- Carneiro, S. P. (2013). Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas por polimerização *in situ* para tratamento de psoríase. Universidade Federal de Ouro Preto - Escola de Farmácia, p. 96.
- Castro, H. G.; Perini, V. B. M.; Santos, G. R. & Leal, T. C. A. B. (2010). Avaliação do teor e composição de óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 2, p. 308-314.
- Chagas, A. C. S.; Passos, W. M.; Prates, H. T.; Leite, R. C.; Furlong, J. & Fortes, I. C. P. (2002). Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsificáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253.
- Chen, G. & Tao, D. (2005). An experimental study of stability of oil-water emulsion. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 499-508.
- Chisowa, E. H. (1997). Chemical composition of flower and leaf oils of *Cymbopogon densiflorus* Stapf from Zambia. *Journal of Essential Oil Research*, v. 9, p. 469-470.
- Costa, F. Q. (2007). Viabilidade de uso de um misturador para a análise de propriedades reológicas de produtos alimentícios. Botucatu - UNESP, p. 100.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318.

- Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A. & Briellmann, H. L. (2006). Natural products from plants. CRC Press - Editora, ed. 2, 632 p.
- Das, M. K. & Ansari, M. A. (2003). Evaluation of repellent action of *Cymbopogon martinii martinii* Stapf var *sofia* oil against *Anopheles sundaicus* in tribal villages of Car Nicobar Island, Andaman & Nicobar Islands, India. Journal of Vector Borne Diseases, v. 40, p. 100-104.
- Dudai, N.; Poljakoff-Mayber, A.; Mayer, A. M.; Putievsky, E. & Lerner, H. R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. Journal of Chemical Ecology, v. 25, n. 5, p. 1079-1089.
- Dutka, B. (1989). Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National water research institute (NWRI), Environment Canada.
- Fernandez, P.; Andre, V.; Rieger, J. & Kuhmle, A. (2004). Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 251, p. 53-58.
- Forgiarini, A.; Esquena, J.; González, C. & Solans, C. (2001). Formation of nanoemulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. Langmuir, v. 17, n. 7, p. 2076-2083.
- Fraga, M. (2007). Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas: estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2. Porto Alegre: UFRGS, p. 104.
- Fronza, T., Campos, A. & Teixeira, H. (2004). Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 23, n. 4, p. 558-566.
- Fumagali, E.; Gonçalves, R. A. C.; Machado, M. F. P. S.; Vidoti, G. J. & Oliveira, A. J. B. (2008). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 4, p. 627-641.
- Ganjewala, D. (2009). *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. International Journal of Essential Oil Therapeutics, v. 3, p. 56-65.
- Garcia, J. P. O. & Lunardi, J. J. (2001). Práticas alternativas de prevenção e controle das doenças dos bovinos. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, p. 46.
- Gaumet, M.; Vargas, A.; Gumy, R. & Delie, F. (2008) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 69, p. 1-9.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374-381.
- Greay, S. J. & Hammer, K. A. (2011). Recent developments in the bioactivity of mono and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. Phytochemistry Reviews.

- Greene, J. C.; Bartels, C. L.; Warren-Hicks, W. J.; Parkhurst, B. R.; Linder, G. L.; Peterson, S. A. & Miller, W. E. (1988). Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. U. S. EPA 600/3-88/029. Corvallis. OR.
- Guerra, M. P. & Nodari, R. O. (2001). Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, capítulo 1, p. 13-26.
- Harper, J. R. & Balke, N. E. (1981). Characterization of the inhibition of k^+ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiologic*, v. 8, n. 6, p. 1349-1353.
- Haskell, R. J. (1998). Characterization of submicron systems via optical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 2, p. 125-129.
- Heiba, H. I. & Rizk, A. M. (1986). Constituents of *Cymbopogon* species. *Qatar University Science Bulletin*, v. 6, p. 53-75.
- Heyder, C. D. T. & Silva, D. A. K. (2004). Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. *Revista Saúde e Ambiência*, v. 5, n. 2, p. 7-12.
- Idson, B. (1993). Stability testing of emulsions: part 2. *Drug Cosmetic Industry*, New York, v. 152, n. 2, p. 38-43.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v. 19, p. 603-608.
- Khanuja, S. P. S.; Shasany, A. K.; Pawar, A.; Lal, R. K.; Darokar, M. P.; Naqvi, A. A.; Rajkumar, S.; Sundaresan, V.; Lal, N. & Kumar, S. (2005). Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, p. 171-86.
- König, F. G.; Schumacher, M. V.; Brun, E. J. & Seling, I. (2002). Avaliação da sazonalidade da produção de serapilheira numa floresta estacional decidual no município de Santa Maria - RS. *Revista Árvore*, Viçosa - MG, v. 26, n. 4, p. 429-435.
- Kourniatis, L. R.; Spinelli, L. S. & Mansur, C. R. E. (2010). Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 295-300.
- Li, H.; Huang, J.; Zhang, X.; Chen, Y.; Yang, J. & Hei, L. (2005). Allelopathic effects of *Cymbopogon citratus* volatile and its chemical components. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, v. 16, p. 763-767.
- Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P. & Souza, E. L. (2006). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 197-201.

- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F.; Grynberg, N. F. & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438.
- Marques, M. C. M. & Oliveira, P. E. A. M. (2004). Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 4, p. 713-723.
- Martini, E. (2005). Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química. Porto Alegre: UFRGS, p. 106.
- Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C. & Dias, J. E. (1995). Plantas medicinais, Viçosa: UFV.
- Maruno, M. (2009). Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. Riberão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, USP, p. 158.
- Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K., Chang, C. B. & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 18, p. 635-666.
- Masson, D.S.; Morais, G.G; Morais, J.M.; Andrade, F.F.; Santos, O.D.H.; Oliveira, W.P. & Rocha-Filho, P.A. (2005). Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence of liquid crystal formation and rheological behavior of o/w emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 26, p. 463-468.
- Menut, C.; Bessiére, J. M.; Samaté, D.; Djibo, A. K.; Buchbauer, G. & Schopper, B. (2000). Aromatic plants of tropical west Africa. XI. Chemical composition, antioxidant and antiradical properties of the essential oils of three *Cymbopogon* species from Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research*, v. 12, p. 207-212.
- Ministério da Saúde. (2006). Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília - DF, 60 p.
- Muller, R. H.; Benita, S. & Bohm, B. H. L. (1998). Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. *Medpharm - 1ª edição*, p. 396.
- Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R. & Formariz, T. P. (2004). Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138.
- Onawunmia, G. O.; Yisak, W. A. & Ogunlana, E. O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 12, p. 279-286.
- Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O. & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e

- determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307.
- Packer, J. F. & Luz, M. M. S. (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 102-107.
- Pays, K.; Mabile, C.; Schmitt, V.; Leal-Calderon, F. & Bibette, J. (2002). Understanding the stability and lifetime of emulsions. *Journal Dispersion Science and Technology*, v. 23, p. 175-186.
- Pereira, T. A. (2011). Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: Avaliação de propriedades cosméticas da formulação. Riberão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, USP, p. 102.
- Pereira, R. S.; Sumita, T. C.; Furlan, M. R., Jorge, A. O. C. & Ueno, M. (2004). Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista Saúde Pública*, v. 38, n. 2, p. 326-328.
- Pianovski, A. R.; Vilela, A. F. G.; Silva, A. A. S.; Lima, C. G.; Silva, K. K.; Carvalho, V. F. M.; Musis, C. R.; Machado, S. R. P. & Ferrari, M. (2008). Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 2, p. 249-259.
- Pires, N. M. & Oliveira, V. R. (2011). Alelopatia. Oliveira Jr., R. S. *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. p. 95-123.
- Potzernheim, M.; Bizzo, H. R.; Agostini-Costa, T. S.; Vieira, R. F.; Carvalho-Cilva, M. & Gracindo, L. A. M. B. (2006). Chemical characterization of seven *Piper* species (piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, p. 10-12.
- Prance, G. T. (1977). Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 64, p. 559-684.
- Probst, I. S. (2012). Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Quintão, F. J. O. (2013). Caracterização dos óleos essenciais de *Microlicia graveolens*, *Melaleuca leucadendron* e de extratos hidroalcoólicos das folhas e caules de *Vellozia squamata* para o desenvolvimento de nanoemulsões para uso farmacêutico. Ouro Preto - UFOP, p. 116.
- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. London: Academic Press, p. 422.
- Rodríguez-Rojo, S.; Varona, S.; Núñez, M. & Cocero, M. J. (2012). Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products*, v. 37, n. 1, p. 137-140.

- Roland, I.; Piel, G.; Delattre, L. & Evrard, B. (2003). Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 263, p. 85-94.
- Romminger, S. (2013). Isolamento, identificação e investigação de rotas biossintéticas de produtos naturais de microrganismos marinhos. Instituto de Química de São Carlos, USP.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza, CE. ISSN 1679-6535.
- Santos, J. C.; Filho, C. D. C.; Barros, T. F. & Guimarães, A. G. (2011). Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina : Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564.
- Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R. & Alves, S. H. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808.
- Shinoda, K. (1968). The correlation between the dissolution state of nonionic surfactant and the type of dispersion stabilized with the surfactant. *Journal Colloid Interface Science*, v. 24, p. 4-9.
- Silva, J. G.; Souza, I. A.; Higino, J. S.; Siqueira-Junior, J. P.; Pereira, J. V. & Pereira, M. S. V. (2007). Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 4, p. 572-577.
- Silva, A. P. C. (2006). Nanoemulsões contendo genisteína: estudo de formulação e permeação cutânea. Porto Alegre: UFRGS, p. 95.
- Silvander, M.; Hellstrom, A.; Warnheim, T. & Claesson, P. (2003). Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions effects of electrolyte concentration and presence of heparin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 252, p. 123-132.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (2010). *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. UFSC - 6ª edição, p. 1104.
- Simões, C. M. O. & Schenkel, E. P. (2002). A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 35-40.

- Singh, H. P.; Batish, D. R.; Kaur, S.; Kohli, R. K. & Arora, K. (2006). Phytotoxicity of the volatile monoterpene citronellal against some weeds. *Z. Naturforsch.*, v. 61, p. 334-340.
- Soenarko, S. (1977). The genus *Cymbopogon* Sprengel (Gramineae). *Reinwardtia*, v. 9, n. 3, p. 225-375.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S. & Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, 351-355.
- Souza Filha, A. P. S. (2002). Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 20, n. 3, p. 357-364.
- Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J. & Solans, C. (2004). Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 109, p. 303-318.
- Takaisi-Kikuni, N. B.; Tshilanda, D. & Babady, B. (2000). Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 69-71.
- Takaisi-Kikuni, N. B.; Kruger, D.; Gnann, W. & Wecke, J. (1996). Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, v. 88, p. 55-62.
- Veiga Jr. V. F.; Pinto, A. C. & Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528.
- Vicentino, A. R. R. & Menezes, F. S. (2007). Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 384-387.
- Vizzoto, M.; Krolow, A. C. & Weber, G. E. B. (2010). Metabólitos secundário encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p.
- Wang, W. (1987). Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, v. 6, p. 409-414.
- Watson, L. & Dallwitz, M. J. (1992). The grass genera of the world. Wallingford: C.A.B. International. 1081 p.
- World Health Organization. (2003). Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva.
- World Health Organization. (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva.