



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



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESPECTROSCÓPICA E ESTUDO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO OLEO ESSENCIAL DE *Croton Cajucara* BENTH

JASON JERRY ATOCHE MEDRANO

RIO BRANCO

2014



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



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESPECTROSCÓPICA E ESTUDO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO OLEO ESSENCIAL DE *Croton Cajucara* BENTH

JASON JERRY ATOCHE MEDRANO

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

Orientador _____

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Coorientador _____

Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria

Rio Branco – Acre

Fevereiro 2014

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

JASON JERRY ATOCHE MEDRANO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESPECTROSCÓPICA E ESTUDO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO OLEO ESSENCIAL DE *Croton Cajucara* BENTH

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/ 02 /2014

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez
(Orientador – CCBN/UFAC)

Prof. Dr. José Antonio Huamani Coaquira (Membro)
(Universidade de Brasília - UnB)

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha (Membro)
(CCBN/UFAC)

Dedicatoria

A todas as pessoas que em meio das circunstancias adversas da vida, se abrem passo entre as lágrimas, suor e sacrifício até conseguir concretizar seus anelos. Estas linhas são um tributo a elas.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez e ao coorientador Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria, pelo apoio científico na realização do trabalho.

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

À Fundação de Tecnologia do Acre no uso do Laboratório de Produtos Naturais.

Ao Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FDCT.

Ao pessoal da Embrapa Acre, técnicos e pesquisadores, por me auxiliar na procura do material botânico.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de estudo.

Aos professores, que tive, nos diferentes cursos do mestrado, todos eles contribuíram enormemente nesta pesquisa.

Ao professor Dr. Renildo Moura da Cunha, pela paciência, tempo e dedicação para transmitir seus conhecimentos.

Ao professor Carronberth Carioca Fernandes, pela orientação brindada nos temas de química.

Ao professor Dr. Erivaldo Socrates Egyto, por dar-me uma nova visão sobre o que significa fazer pesquisa.

Ao professor Dr. Igor Anatolievich Degterev, pelas orientações e críticas muito acertadas.

Ao Dr. Cesar Silvino Gomes da Superintendência da Polícia Federal no Estado do Acre por me auxiliar nas análises espectroscópicas feitas no laboratório.

Ao professor Sebastião do Instituto de Física da Universidade de Brasília, IF- UnB.

Ao professor Rafael Tanaka da UNESP.

Ao professor Judes Gonçalves dos Santos da Universidade Federal de Rondônia.

A todos e cada um dos meus amigos e colegas de estudos no laboratório, que fizeram os dias de trabalho mais motivadores.

A Rosenato Pontes Correa, quem foi a primeira pessoa que me recebeu quando eu cheguei ao Brasil.

A Tatiana Sahi, pelo apoio brindado.

O verdadeiro sentido da vida é dar a sua vida um sentido.

Miyamoto Musashi
Livro dos cinco anéis
Século XVII

RESUMO

Croton Cajucara Benth, conhecida popularmente como Sacaca é uma planta comumente usada na parte norte do Brasil, para tratar doenças gastrointestinais. Nesse trabalho foram avaliadas as propriedades físico-químicas e atividade antinociceptiva do óleo essencial e nanoemulsão do óleo essencial de *Croton Cajucara Benth*. Conseguiu-se extrair óleo essencial das folhas de *Croton Cajucara Benth*, por hidrodestilação, com um rendimento de 0.8%. As análises espectroscópicas CG-MS apresentaram 44 componentes, encontra-se majoritariamente terpenoides como o linalol, α -pineno, cariofileno. A análise por espectroscopia infravermelha (FT-IR) mostrou a presença de grupos funcionais hidroxila, na faixa da impressão digital (1800-600 cm^{-1}). A partir do óleo essencial de *Croton Cajucara Benth* foi feito uma nanoemulsão (O/A), pelo método de alta energia usando sonificador obtendo-se uma nanoemulsão cineticamente estável com diâmetro na media de 35 nm por gotículas, estudadas a partir de curvas de potencial zeta. A avaliação dos efeitos antinociceptivos quando administrado nas doses testadas de 30 mg/kg até 2 g/kg via oral (v.o), não provocou manifestações gerais de toxicidade nos animais. Para todos os outros testes foram usadas doses de (30-100-300 mg/kg). No teste Rota Rod, foi administrada v.o óleo essencial e nanoemulsão de *Croton Cajucara Benth*, não apresentando alterações na performance motora. No teste das contorções abdominais do óleo essencial de *Croton Cajucara Benth* administrado por v.o inibiu significativamente o número de contorções respeito ao grupo controle indicando uma ação de analgesia periférica e no caso da nanoemulsão, apresentou uma diminuição no número de contorções abdominais para a doses de 30 mg/kg, não apresentando doses dependência na sua atividade antinociceptiva. O óleo essencial de *Croton Cajucara Benth* causou um aumento significativo moderado no tempo de reação no teste da placa quente respeito ao grupo controle, no entanto para a nanoemulsão não apresentou um aumento no tempo de reação significativo. Na atividade antiinflamatória, mostraram que o óleo essencial de *Croton Cajucara Benth* administradas v.o inibiu de forma muito moderada o edema da pata induzido por carragenina. Entretanto para a nanoemulsão de óleo essencial de *Croton Cajucara Benth* os resultados não apresentaram atividade antiinflamatória.

PALAVRAS CHAVES: *Croton Cajucara* Benth. Óleo essencial. Espectroscopia. Nanoemulsão. Atividade antinociceptiva.

ABSTRACT

Croton Cajucara Benth (CCB), popularly known as Sacaca is a plant commonly used in the northern part of Brazil to treat gastrointestinal diseases. In this work the physicochemical properties and biological antinociceptive activity of essential oil (EO) of CCB and the OE nanoemulsion were evaluated. We succeeded by hydrodistillation, the extraction of essential oil (EO) from the leaves of the CCB, with a yield of 0.8%. Spectroscopic analysis by GC-MS of OE from CCB resulted in 44 components, being the terpenoids as linalool, α -pinene and caryophyllene the most predominant. Infrared analysis (FT-IR) showed the presence of hydroxyl functional groups in the range of the fingerprint (1800-600 cm^{-1}). The EO was used to make a nanoemulsion (O / W) by the method of high energy using a sonicator. This method made possible the production of a kinetically stable nanoemulsion with a mean diameter of 35 nm droplets as shown by potential zeta curves. The evaluation of the antinociceptive effect of EO from CCB when tested in doses of 30 mg/kg to 2 g/kg orally caused no signs of general toxicity in animals. For all other tests, doses of (30-100-300 mg/kg) were used. For the rota rot test, the EO of CCB and nanoemulsion were administered orally showing no changes in motor performance. On the other hand, for the writhing test, the EO of CCB administered orally showed a significant inhibition in the number of writhes compared to the control group indicating an action of peripheral analgesia. In addition the nanoemulsion presented a diminution in the number of writhing for doses of 30 mg/kg, showing no dose dependency in its antinociceptive activity. The EO of CCB caused a significant increase in reaction time in the hot plate test of the control group; however the nanoemulsion didn't show a significant increase in the reaction time mean. Furthermore, the anti-inflammatory activity of EO from CCB administered orally had inhibited moderately the paw edema which was induced by carrageenan. Overall, the nanoemulsion of EO from CCB results not showed an anti-inflammatory activity.

KEYWORDS: *Croton Cajucara* Benth. Essential oil. Spectroscopy. Nanoemulsion. Antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do linalol, (a) estrutura em 2D; (b) estrutura em 3D	7
Figura 2. Planta de sacaca (Croton Cajucara Benth). Foto- Jason J. Atoche.	9
Figura 3. Emulsão de um líquido disperso em outro. O dispersante é um tensoativo, um polímero ou um pó que apresenta propriedades de um e outro.	15
Figura 4. Representação de microemulsões, gotículas muito pequenas de uma fase são dispersas na outra, por uma mistura de tensoativos.	16
Figura 5. Estrutura das microemulsões, adaptado de Gomes de Oliveira, 2004.	18
Figura 6. Escala de granulometria das emulsões adaptado de (ANSEL, 1999).	19
Figura 7. Coleta do material botânico Croton Cajucara Benth (CCB). Foto- Jason J. Atoche.	23
Figura 8. Secagem do material botânico. Foto- Jason J. Atoche.	24
Figura 9. Sistema clewenger modificado para extração de OE. Foto- Jason J. Atoche.	25
Figura 10. Folhas selecionadas da espécie Croton Cajucara Benth. Foto- Jason J. Atoche.	26
Figura 11. Equipamento clewenger. Foto- Jason J. Atoche.	27
Figura 12. Refratômetro de bancada Abbé. Foto- Jason J. Atoche.	28
Figura 13. Fenoltaleina usada na titulação do OECC. Foto- Jason J. Atoche.	29
Figura 14. Papel tornasol utilizado para medir o valor de pH. Foto- Jason J. Atoche.	30
Figura 15. Espectrofotômetro UV-VIS usado para medições da amostra de	31

OE. Foto- Jason J. Atoche.

Figura 16. FT-IR usado para verificar os grupos funcionais do OE. Foto- Jason J. Atoche. 31

Figura 17. CG-MS usado para identificar os possíveis componentes do OE. Foto- Jason J. Atoche. 33

Figura 18 Representação do diagrama ternário (ZANATTA, 2008).. 34

Figura 19. Formação da nanoemulsão de OE da CCB usando método de alta energia no aparelho sonificador. Foto- Jason J. Atoche. 36

Figura 20. Espectro de Absorbância UV-VIS para OECC. 43

Figura 21. Espectro de TF-IR para a amostra de OECC. 44

Figura 22. Espectro de TF-IR para a amostra CCB, mostrando os grupos funcionais. 45

Figura 23. Espectroscopia TF-IR região finger print do OE da CCB 46

Figura 24. O linalol como componente majoritário identificada pelo software do equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. 48

Figura 25. Cromatografia gasosa acoplada a massa CG-MS do OECC 49

Figura 26. Sistema nanoemulsionado com OE de CCB. Foto- Jason J. Atoche. 49

Figura 27. Fase da medição do potencial zeta realizada em nanoemulsão do OE de CCB. 50

Figura 28. Fase da medição do potencial zeta realizada em nanoemulsão do OE de CCB. 51

Figura 29. Efeito inibitório da administração prévia do OECC sobre as contorções abdominais de camundongos induzidas pela injeção intraperitoneal 53

do ácido acético 0.8 %. As barras representam as médias±epm e **p<0.01.

Figura 30. Efeito inibitório da administração prévia do OECCn sobre as contorções abdominais de camundongos induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0.8 %. As barras representam as médias±epm de n=8 e (*) p<0.05. 54

Figura 31. Efeito antinociceptivo da administração prévia do OECC sobre a nocicepção térmica induzida, em patas de camundongos submetidos ao teste da placa quente. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001. 56

Figura 32. Efeito antinociceptivo da administração prévia do OECCn sobre a nocicepção térmica induzida, em patas de camundongos submetidos ao teste da placa quente. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001. 57

Figura 33. Efeito da administração prévia do OECC sobre o desempenho motor de camundongos submetidos ao teste do Rota Rod. As barras representam as médias±epm de n=8. 58

Figura 34. Efeito da administração prévia do OECCn sobre o desempenho motor de camundongos submetidos ao teste do Rota Rod. As barras representam as médias±epm de n=8. 59

Figura 35. Efeito inibitório do tratamento prévio com OECC (v.o.) e indometacina (ip.) sobre a expressão do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em patas de camundongos. Os pontos representam as médias±epm de n=8, (*) p<0.05 e (***) p<0.001. 61

Figura 36. Efeito inibitório do tratamento prévio com OECCn (v.o.) e indometacina (ip.) sobre a expressão do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em patas de camundongos. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química (%) do óleo essencial da casca de CCB (Índice de Kovat)	9
Tabela 2- As seis maiores classes de emulsões	17
Tabela 3- Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário	34
Tabela 4- Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário	35
Tabela 5- Teor de OE de CCB, determinado em base seca	42
Tabela 6- Índice de saponificação para o OE da CCB	44
Tabela 7- Componentes majoritários percentuais do OE de CCB	49

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Rendimiento (%) do óleo essencial em base seca	23
Equação 2- Densidad de uma substancia	25
Equação 3- Índice de saponificação	26

LISTA DE ABREVIATURAS

OE- Óleo essencial

CCB- *Croton Cajucara* Benth

ME- Microemulsões

TF-IR- Infravermelho com transformada de Fourier

v.o - Via oral

v.i – Via intraperitoneal

v/v - Volume por volume

SNC - Sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1.1 Introdução	1
Capítulo 2	4
2.1 Revisão da literatura	4
2.2 O sentido do olfato	5
2.3 Óleos essenciais no desenvolvimento de novos produtos medicinais	7
2.4 Química dos produtos naturais	8
2.5 <i>Croton Cajucara Benth (CCB)</i>	8
2.5.1 Uso popular com fim fitoterapêutico da sacaca	10
2.6 Óleos essenciais	11
2.6.1 Obtenção de óleos essenciais	13
2.7 Hidrodestilação	14
2.8 Emulsões	14
2.8.1 Classificação de emulsões e ação dos surfactantes	15
2.8.1.2 < 30% de volume de fase interna	17
2.8.1.3 A partir de 30% de volume de fase interna	17
2.8.1.4 A partir de 74% de volume de fase interna	17
2.8.2 Microemulsões	17
2.8.3 Nanoemulsões	18
2.8.3.1 Métodos de obtenção das nanoemulsões	19

2.8.3.2 Métodos que utilizam alta energia de emulsificação	19
2.9 Potencial zeta	20
Capítulo 3	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
Capítulo 4	23
MATERIAL E METODOS	23
MATERIAL	23
4.1 Coleta das folhas	23
4.2. Balança eletrônica de precisão	24
4.2.1 Processador	24
4.2.2 Secador convectivo de bandejas	24
4.2.3 Aparelho clevenger	25
4.2.4 Cálculo do rendimento (%) do óleo essencial da <i>Croton Cajucara Benth</i>	25
METODOS	25
4.3 Seleção do material botânico	26
4.3.1 Extração do óleo essencial da <i>Croton Cajucara Benth</i>	26
4.4 Análises Físico-Químicas do óleo essencial da <i>Croton Cajucara Benth</i>	27
4.4.1 Índice de refração	27
4.4.2 Medida da densidade do óleo essencial	28
4.4.3 Medida do índice de saponificação	28

4.4.4 Medida do pH	29
4.5 Análises espectroscópicas do óleo essencial da espécie <i>Croton Cajucara</i> Benth	30
4.5.1 UV-VIS	30
4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	31
4.6 Análises cromatográfico do OECC	32
4.6.1 Cromatografia gasosa acoplada a massa (CG-MS)	32
4.7 Preparação das Nanoemulsões	33
4.7.1 Obtenção das nanoemulsões	35
4.7.2 Avaliações da estabilidade da nanoemulsão	36
4.8 Testes biológicos <i>in vivo</i>	37
4.8.1 Investigação da atividade antinociceptiva	37
4.8.2 Determinação da toxicidade aguda	37
4.8.3 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (writhing test)	38
4.8.4 Teste da placa quente (Hot Plate)	38
4.8.5 Medida do desempenho motor (teste do Rota Rod)	39
4.8.6 Edema de pata induzido pela carragenina	39
Capítulo 5	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Rendimento do óleo essencial da espécie <i>Croton Cajucara</i> Benth	40
5.2 Caracterização Físico-Química	40
5.2.1 Índice de refração	40

5.2.2 Medida da densidade	41
5.2.3 Índice de saponificação	42
5.2.4 Medida do pH	42
5.3 Medidas espectroscópicas	43
5.3.1 Espectroscopia UV-VIS	43
5.3.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (TF-IR)	44
5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa CG-MS	47
5.4 Nanoemulsões	49
5.4.1 Potencial Zeta	50
5.5 Testes biológicos com óleo essencial da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i>	51
5.5.1 Toxicidade aguda do óleo essencial da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i>	52
5.5.2 Efeito do óleo essencial da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i> sobre as contorções abdominais em camundongos induzidas por ácido acético em camundongos	52
5.5.3 Efeitos da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i> sobre a nocicepção térmica em placa quente em as patas de camundongos.	54
5.5.4 Efeitos da administração oral da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i> sobre a performance motora de camundongos submetidos ao Rota Rod	57
5.5.5 Efeito da espécie <i>Croton Cajucara Benth</i> sobre o edema induzido por carragenina em patas camundongos	59
CONCLUSÕES	63

Capítulo 1

1.2 Introdução

A bioatividade dos óleos essenciais, sua fragrância e sabor têm sido utilizados há muitos anos desde a antiguidade. O óleo essencial é uma mistura de vários componentes que possuem características aromáticas de uma espécie vegetal e têm sido conhecidos por sua bioatividade, incluindo atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngico, antioxidantes, etc. Consequentemente estudos das atividades biológicas dos óleos essenciais têm sido incrementados consideravelmente na procura de medicinas naturais alternativas nos recentes anos (SHAABAN, *et al.*, 2012). Sua função endócrina envolve a estimulação de glândulas para a produção de hormônios e a atuação de alguns óleos como fitoterapêuticos; no sistema nervoso, poucos estudos criteriosos foram feitos a respeito, mas se conhece sua ação como estimulantes e sedativos, desenvolvendo a memória e o raciocínio (RISSATO *et al.*, 2004). A fitoterapia é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças, óleos essenciais compreendem de uma mistura de substâncias voláteis extraída de plantas para predispor à prevenção, à cura e ao equilíbrio psicossomático.

A ação dos componentes dos óleos essenciais pode se dar por contato com a pele: penetração e conseqüente alcance da corrente sanguínea, ou por estimulação do sistema nervoso central pelo processo de transdução. Pode-se, portanto, dizer que são três os sistemas fundamentais para se processar a aromaterapia: circulatório, límbico e olfativo (ANDREI *et al.*, 2005). O óleo essencial apresenta uma composição complexa de diferentes compostos químicos, onde eles apresentam ação sinérgica ou complementar entre si, modalizando sua atividade, óleo essencial possuindo geralmente de odor agradável e intenso, na maioria em forma líquida, encontradas em diferentes órgãos vegetais e são solúveis em solventes polares. Os óleos essenciais são voláteis, e são amplamente utilizados na indústria dos perfumes, cosméticos, aroma de alimentos e bebidas, além do uso na aromaterapia para tratamento de algumas doenças (RAINHA, *et al.*, 2013). Entre seus principais componentes podemos encontrar os terpenoides e fenilpropanoides, que são os responsáveis por dar as propriedades medicinais para o uso na medicina e biologia no tratamento de doenças (TSAO e ZHOU *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2009).

O conhecimento tradicional atualmente é uma fonte para pesquisas na busca por novos compostos biologicamente ativos e como terapêutica efetiva que contemple os cuidados atuais para a saúde. Políticas de saúde utilizando estas fontes têm sido incentivadas por organizações internacionais e nacionais, como a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil. A Aromaterapia e os OEs são uma destas vertentes que estão em ascensão comercial. A dor aguda tem um valor biológico adaptativo já que se desenvolve em resposta a um estímulo potencialmente nocivo ao tecido atuando como um sinalizador da integridade tecidual, promovendo respostas protetoras (AGUGGIA, 2003; VITOR *et al.*, 2008).

A dor aguda é a consequência da ativação do sistema nociceptivo. Tem a função de proteção biológica (nível de alarme do tecido lesionado). Pode ser devido a estimulação química, mecânica ou térmica de nociceptores específicos.

A dor crônica, por sua vez, não possui caráter protetor. Sua duração excede a do reconhecimento natural de um estímulo e pode estar presente na ausência de qualquer agente indutor identificável (CHONG, 2003). Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça contínua ou recorrente. (VITOR *et al.*, 2008). A dor aguda consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja térmico, químico ou mecânico, ocorrendo ativação contínua das vias centrais da dor (BASBAUM *et al.*, 2009). Já a dor neuropática, segundo a IASP, é definida como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária no sistema nervoso central (SNC) e/ou Periférico (SNP). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores.

A inflamação é definida como uma resposta do organismo, especificamente dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos. Sua manifestação envolve diversos eventos de natureza vascular e celular, que obedece a um padrão semelhante, independente da natureza do estímulo. Entretanto, podem ocorrer pequenas variações dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou órgão afetado e da existência de estados patológicos. Segundo ROBBINS *et al.*, (2005) a inflamação é uma reação complexa a vários agentes nocivos, como microorganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas.

É fundamentalmente um mecanismo de defesa, cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das consequências de tal lesão. Pode ser compreendida como uma resposta a qualquer tipo de injúria tecidual, seja por agente mecânico, químico ou por microorganismo. Esta resposta inflamatória envolve um complexo conjunto de atividades enzimáticas, liberação de mediadores, extravasamento de fluidos corpóreos, migração e reparo celular (RUBIO, *et al.*, 2013). Efeitos anti-inflamatórios podem ser atribuídos a uma grande variedade de agentes químicos distintos, muitos deles de origem vegetal, e não existe uma correlação evidente entre a atividade farmacológica e suas estruturas químicas (CORRÊA, *et al.*, 2008).

Capítulo 2

2.1 Revisão da literatura

O conhecimento tradicional atualmente é uma fonte para pesquisas na busca por novos compostos biologicamente ativos e como terapêutica efetiva que contemple os cuidados atuais para a saúde. Políticas de saúde utilizando estas fontes têm sido incentivadas por organizações internacionais e nacionais, como a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil. A Aromaterapia e os óleos essenciais são uma destas vertentes que estão em ascensão comercial e como objeto de estudo deste trabalho. Aromaterapia, esse conhecimento se expandiu ao longo dos séculos em diversas culturas, e constitui a base da Aromaterapia: tratar a saúde do corpo, da mente e do espírito através da utilização de óleos essenciais, a forma mais concentrada de energia vegetal. A Aromaterapia moderna nasceu com trabalhos desenvolvidos pelo químico francês René-Maurice Gattefossé.

A Aromaterapia é um ramo da medicina natural que emprega óleos essenciais visando resolver os problemas do homem dentro de uma concepção holística. Os tratamentos com óleos essenciais datam de aproximadamente 6.000 a.C. Egípcios e mesopotâmicos já os empregavam em medicamentos, cosméticos e rituais religiosos. Outras referências sobre essas substâncias aromáticas também podem ser encontradas em passagens da Bíblia. Através dos tempos, seu uso nunca foi esquecido. Sabe-se que na Idade Média os europeus, convencidos de seu poder antisséptico, usaram ostensivamente plantas odoríferas para combater a peste negra. No início deste século, a pesquisa científica sobre o uso dos óleos essenciais teve início por intermédio do químico francês René Maurice Gatterfossé, que teve seu trabalho motivado por uma experiência pessoal. Ao utilizar óleo essencial de lavanda para tratar sérias queimaduras que sofrera numa das mãos, ele constatou seu grande potencial regenerador, lançando-se então a estudar as aplicações terapêuticas dos óleos. Mais tarde, ele criaria o termo “Aromaterapia” (BUCKLE, 1993).

2.2 O sentido do olfato

Os óleos e seus aromas desempenham um papel importante em nossas emoções, por causa da originalidade e distinção do olfato, entre todos os outros sentidos, para provocar impactos sobre o nosso estado emocional, e isso porque existe uma conexão direta entre ele e o centro emocional do cérebro, ou seja, o sistema límbico, que além das emoções controla também as principais funções do corpo. Os aromas que são lembrados (sejam eles de maneira consciente ou inconsciente) produzem efeitos tanto positivo como negativo, por isso, as emoções que um aroma desperta podem ser distintas em diferentes pessoas, conforme as experiências passadas de cada uma. Por exemplo, um homem poderá fazer associações prazerosas com o odor de um batom, caso o tenha vivenciado previamente numa noite romântica, no entanto, a emoção que vier á tona poderá ser desagradável, caso a experiência com esse batom tenha sido com um copo sujo num restaurante.

Os óleos essenciais penetram em nosso corpo principalmente por inalação e absorção através dos poros da pele (não usar puros, exceto lavanda e sim com um carregador, podendo ser um óleo vegetal, de preferência prensado a frio, devido a suas propriedades). A respiração é uma das técnicas de relaxamento mais eficazes. Inspirar profundamente e soltar o ar não apenas acalma, mas desencadeia efeitos fisiológicos que estimulam a liberação de endorfinas (substâncias que produzem a sensação de bem estar) e minimiza a produção de cortisol, o hormônio do estresse. As moléculas dos óleos essenciais após penetrarem no nariz podem seguir dois caminhos simultaneamente: a maioria dirige-se inevitavelmente para o pulmão e as outras seguem para o cérebro. No pulmão, as moléculas dos óleos essenciais provocam imediatamente um efeito físico e são capazes de atingir a corrente sanguínea que as distribuirá por todo o corpo, onde podem ter efeitos sobre qualquer órgão por onde passam. O sentido do olfato é o único capaz de proporcionar uma conexão direta com o centro emocional do cérebro. Para se tiver ideia, perto de 75% das emoções que experimentamos diariamente são provocadas por aromas. Existe aromatização de ambientes que são algumas formulações funcionais de fragrâncias para áreas de trabalho, que auxiliam no estímulo e na renovação da força produtiva da equipe, após o retorno das festas de fim de ano: O Alecrim é indicado para cansaço mental, falta de entusiasmo e concentração, além de revigorar e estimular a autoestima. O Basilicão é indicado como tônico

nervoso, combatendo fadiga, ansiedade e melancolia. Capim Limão é indicado para quem tem excesso de preocupação, tensão mental e insônia. Hortelã-pimenta é estimulante e refrescante, é indicado para ambientes com grande concentração de pessoas. Flor de Laranjeira combate a insônia, palpitações e estados depressivos.

Nesse processo de despertar os sentidos, podemos reforçar três pontos: autoestima, determinação e equilíbrio emocional. Eles conduzem equipes profissionais à assertividade e melhores resultados, trazendo também retornos individuais e aliando a satisfação profissional à pessoal. Um aroma é suficiente para despertar fome, provocar desejo ou evocar memórias. O sentido do olfato foi essencial para que nossos ancestrais detectassem a aproximação de predadores e identificassem alimentos estragados e venenosos. Esse sentido decifra mensagens o tempo todo e não raro é responsável pela atração ou repulsa que sentimos por algo. Ele tende a ser menos apurado com a idade principalmente se há doenças neurodegenerativas, o que agrava a sensação de desorientação e isolamento. No entanto, pesquisadores do Centro Médico Langone da Universidade de Nova York desenvolveram uma sequência de exercícios que recupera o olfato em ratos.

Em um experimento relatado na revista *Nature Neuroscience*, o neurocientista Donald Wilson conseguiu identificar, monitorando a atividade cerebral de roedores colocados em uma caixa com três orifícios de onde saíam odores diferentes, atividade reduzida do córtex piriforme (associado à percepção de cheiros por estudos anteriores), o que indicava possíveis deficiências olfativas, e treinou os roedores a distinguir odores associando-os a recompensas. Segundo Wilson, o córtex piriforme dos ratinhos treinados passou a apresentar respostas diferentes para cada odor. Embora não haja constatação de que a capacidade de distinguir cheiros em humanos possa ser aprimorada com exercícios, a descoberta pode ajudar a entender e a tratar os distúrbios olfativos que surgem em estágios avançados de Alzheimer e Parkinson. Em base neste argumento nossa pesquisa esta direcionada ao estudo dos óleos essenciais *Croton Cajucara Benth.*

2.3 Óleos essenciais no desenvolvimento de novos produtos medicinais

O linalol é um terpenoide alcoólico que possui uma demanda muito grande pela indústria da perfumaria. Nas últimas décadas, a árvore da espécie pau de rosa (*Aniba rosaeodora Ducke and A. duckey Kosterm*) foi explorada como principal fonte desta substância e devido a contínua exploração, essa espécie chegou a estar ameaçada e em perigo de extinção. Procurando reduzir esta ameaça, há trinta anos, um grupo de plantas consideradas como possíveis provedores de linalol foram encontrados na região amazônica. (PEIXOTO *et al.*, 2013), e a *Croton Cajucara Benth* foi considerada uma interessante alternativa do *pau de rosa*, devido a sua facilidade para ser cultivada e porque apresenta um alto percentagem de linalol em seu óleo essencial extraído das folhas (SETZER, 2006).

Linalol ($C_{10}H_{18}O$) é um álcool monoterpênico de cadeia aberta mostrado na Figura (1a), (1b), e é encontrado na natureza sob a forma de mistura de isômeros nos OEs em várias espécies de plantas aromáticas. Possui um átomo de carbono assimétrico, o que possibilita a existência dos enantiômeros (+) linalol e (-) linalol e ele é utilizado comercialmente em diversos produtos industrializados na área de cosmética e aromática, perfumaria, ou produto farmacológico, etc. A planta *Croton Cajucara Benth* conhecido popularmente como “sacaca” da família *Euforbiácea*, possui propriedades que tem sido cientificamente demonstrada, especificamente, na redução de glicose e níveis de lipídeos no sangue em ratos e camundongos (SALATINO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2001 a e b).

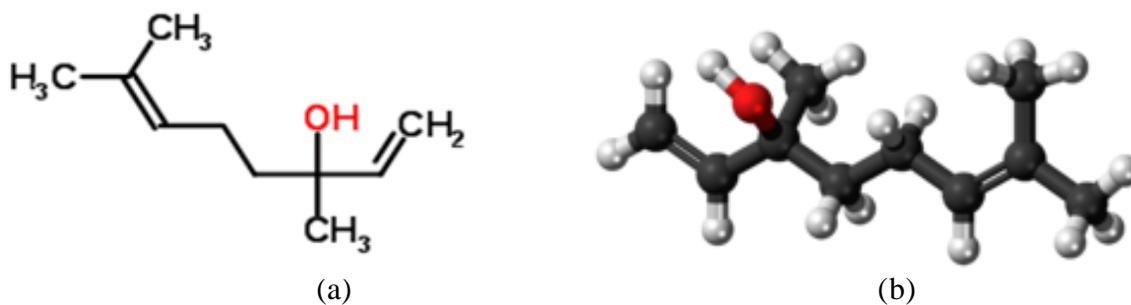


Figura 1. Estrutura do linalol, (a) estrutura em 2D; (b) estrutura em 3D.

2.4 Química dos produtos naturais

Durante muito tempo o estudo de plantas medicinais com fins terapêutico têm sido característico da espécie humana (OLIVEIRA *et al.*, 2011) desde tempos ancestrais até o século XX, considerando significativamente o uso-valor como fator que encaminhou o desenvolvimento da botânica como ciência. Durante muito tempo de nossa história a medicina e a botânica não eram disciplinas tão distintas e sim um conjunto de conhecimentos anexados utilizados por os povos na antiguidade, para tratar doenças (GEOFFREY *et al.*, 2001).

2.5 *Croton Cajucara Benth*

Croton Cajucara Benth (*Euforbiácea*) encontra se amplamente, na parte norte do Brasil na região Amazônica, onde é conhecida popularmente como ‘sacaca’, casca-sacaca, muirá-sacaca, caá-juçara e cajuçara (Figura 2). São utilizadas pela população a casca e as folhas da *Croton Cajucara Benth*, na forma de infusão, óleo, cápsulas, pílulas e extratos. A *Croton Cajucara Benth* tem registro na literatura especializada de vários princípios ativos isolados como a transdehydrocrotonina, cajucarinolide e iso-cajucarinolide, cajucarín, diterpeno clerodane, linalol entre outros (PEREIRA *et al.*, 2011).

As plantas de *Croton cajuçara Benth* podem ser morfológicamente classificadas como brancas ou vermelhas, de acordo com a cor das folhas, especialmente folhas jovens nos galhos recém-desenvolvidos. O componente principal do óleo essencial destes dois morfotipos é o linalol e o hidroxicalameneno, respectivamente, como demonstrado por experimentos de cromatografia a gás realizado recentemente (CHAVES *et al.*, 2006). A planta *Croton Cajucara Benth* é um arbusto de folhas lanceoladas, dotadas de pecíolo, de até 14 cm de comprimento por 5 cm de largura, de coloração verde ou pardacenta e suas flores em racimos terminais de 6 a 9 cm de comprimento. Apresenta ainda casca pulverulenta e aromática (CONCEIÇÃO, *et al.*, 2002).



Figura 2. Planta de sacaca (*Croton Cajucara Benth*).
Foto- Jason J. Atoche

Entre os principais componentes do óleo essencial da *Croton Cajucara Benth* encontram-se na Tabela 1, segundo (DA SILVA *et al.*, 2013).

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial da casca de Cajucara Benth (Índice de Kovat).

Componentes	%	KI calculado	KI* standart
α - pineno	T	940	939
campheno	T	956	953
β - pineno	T	982	980
Para-cimene	0.10	1027	1026
limonelo	T	1032	1031
Cis-linalol	T	1073	1074
Trans-linalol	2.79	1102	1098
Trans-pinocarveol	0.03	1147	1139
Cis-verbenol	T	1151	1140
camphor	T	1153	1143
borneol	1.65	1178	1165
4-terpineol	0.27	1185	1177
Para-cimen-8-ol	T	1191	1183
α -terpineol	0.15	1200	1189

Componentes	%	KI calculado	KI* standart
Cis-verbenone	T	1214	1204
Trans-carveol	T	1224	1229

t: oligoelementos com porcentagens menores a 0.03%,

2.5.1 Uso popular com fim fitoterapêutico da sacaca

A *Croton Cajucara Benth* é muito conhecida e utilizada tradicionalmente pela população na região de Acre no Brasil. As folhas como infusão, macerados feitos da casca e inclusive misturados com outras espécies para tratar doenças gastro intestinais, do fígado, rins, úlceras, até como método antimicrobiano e para emagrecer (PORT'S *et al.*, 2013).

Os primeiros dados químicos da *Croton Cajucara Benth* e seu uso na medicina tradicional foram relatados por (MÜLLER *et al.*, 1986 & VAN DEN BERG, 1993). Informação etnofarmacológica indica que as folhas e casca do caule da *Croton Cajucara Benth*, são usadas na região amazônica para cuidados de saúde primária, especialmente no tratamento de doenças do fígado e renais, e também para diminuir o colesterol no sangue (FALCÃO *et al.*, 2008). A planta é usada para tratar a diabetes, diarreia, dor de estômago, febre, icterícia, hepatite e malária (NARDI *et al.*, 2006). Recentemente, o uso das folhas da *Croton Cajucara Benth* foi recomendado para uso terapêutico nas pessoas que tem excesso de peso e, mais o uso prolongado tem sido correlacionado com hepatite tóxica frequente em Belém (MACIEL *et al.*, 2006).

O uso prolongado para o emagrecimento tem efeitos ontogênicos atribuídos principalmente ao seu teor de ésteres de diterpenos do forbol (RODRIGUES *et al.*, 2013). As folhas desta planta revelou a presença de três esteroides (b-sitosterol, estigmasterol e sitosterol-3-O-b-glucósido), dois flavonoides (campferol 3,4% de éter, 7-trimetil e éter 3,7-dimetil) e um diterpeno do tipo clerodano (cajuarinolide) e da casca do caule foi encontrado uma rica fonte de clerodanos (MOTTA *et al.*, 2011).

2.6 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são geralmente uma mistura complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos. Os hidrocarbonetos mais freqüentemente encontrados pertencem a grupos de substâncias conhecidas como terpenos e, em menor freqüência, sesquiterpenos. Ocorrem em todo tecido vivo da planta, geralmente concentrados na casca, flores, no rizoma e nas sementes (TAWAHA e HUDAIB, 2012). Os monoterpenos mais comuns são: linalol, gerandiol, tujona, cânfora, limoneno entre outros. Entre os sesquiterpenos mais comuns encontram-se: farnesol, nerolidol, bisaboleno entre outros (TURIEL *et al.*, 2013).

Óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas (SIMIONATTO *et al.*, 2011). A atividade antioxidante dos óleos essenciais tem sido bastante estudada (XU *et al.*, 2013) e os óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro constituem fontes potenciais de antioxidantes naturais (DA SILVA *et al.*, 2013).

De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos. Esses óleos possuem grande importância industrial e são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais.

Apresentando também outras características (SIMÕES *et al.* 2003), assim:

- Aparência oleosa à temperatura ambiente; aroma agradável e intenso da maioria dos óleos.
- Solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas.
- Cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados.

- Estabilidade: em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais.
- **A maioria possui índice de refração** e são opticamente ativos.

O óleo essencial é um óleo natural, com odor distinto, segregado pelas glândulas de plantas aromáticas, obtido por processo físico e estrutura química formada por carbono, hidrogênio e oxigênio, dando origem a complexa mistura de substâncias, que podem chegar a várias centenas delas, havendo predominância de uma a três substâncias que caracterizam a espécie vegetal em questão. Essas substâncias apresentam estruturas diversas como ácidos carboxílicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos dentre outras, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

A grande maioria dos óleos essenciais de interesse comercial é uma mistura de hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos. Um segundo componente presente em concentração elevada consiste principalmente de compostos aromáticos. Os terpenos são considerados produtos da fusão de duas ou mais unidades isopreno (C_5H_8), tendo a fórmula geral $(C_5H_8)_n$ e possuem grupos funcionais como OH ou C=O e geralmente são hidrocarbonetos insaturados de estrutura cíclica, assim as unidades de isopropeno originam-se biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico e têm cadeias ramificadas, com cinco unidades de carbono contendo duas ligações duplas (JIN *et al.*, 2008).

A constituição química dos óleos essenciais é muito diversificada e, eles têm algumas propriedades físicas em comum. Possuem odores característicos, alto índice de refração e a maioria são opticamente ativos, sendo sua rotação específica muitas vezes uma propriedade útil do ponto de vista de caracterização (SANTOS *et al.*, 2013). Estes são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, que variam de 2 a 8: os monoterpenos, ou simplesmente terpenos, possuem duas unidades de isoprenos com dez carbonos (duas unidades de isopreno); os sesquiterpenos, três unidades; e os diterpenos, quatro unidades de isopreno. O aroma e o odor destes hidrocarbonetos são muito baixo, comparado com os seus derivados oxigenados. Portanto, o seu teor no óleo é sempre reduzido. Quando os óleos essenciais são absorvidos eles tendem

provavelmente, a se ligar à albumina plasmática. Isso se deve a presença de cetonas ésteres, aldeídos e ácidos carboxílicos no seu esqueleto carbônico. Há possibilidades teóricas que os óleos essenciais possam interagir com drogas, desde que, a via de administração do óleo seja por via oral (LANGEVELD *et al.*, 2014).

O metabolismo dos óleos essenciais ocorre imediatamente após serem administrados. Seus componentes são metabolizados por enzimas hepáticas através de três tipos importantes de reações: oxidação, conjugação em glicuronil e detoxificação por glutina. O principal órgão de excreção é o rim, onde os óleos essenciais presenciais na corrente sanguínea devem ser filtrados. Além disso, por serem extremadamente voláteis, pequenas quantidades podem ser excretadas pela expiração (HOOKER, 2008).

2.6.1 Obtenção de óleos essenciais

Há milhares de anos, os óleos essenciais vêm sendo extraídos de plantas e usados nas indústrias de perfumes, cosméticos e fármacos de uso medicinal. A importância econômica que as plantas aromáticas representam à Região Amazônica está associada à aplicação de seus óleos essenciais e uso de seus aromas em processos tecnológicos. No processo de extração do óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, gases supercríticos e micro-ondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (GUAN *et al.*, 2007).

Entretanto, são necessários conhecimentos mínimos dos fundamentos teóricos das ciências aplicadas, na condução do processo de destilação e na elaboração de projetos de equipamentos para a extração de óleos essenciais, tanto em escala laboratorial quanto industrial. Uma das principais propriedades físicas utilizadas nos projetos de extratores é a densidade do óleo essencial a ser extraído, se mais ($\rho > 1$) ou menos densos que a água ($\rho < 1$), em temperaturas que variam entre 5 °C e 50 °C. Com base nessa propriedade, existem vários tipos de sistemas extratores de óleos essenciais, mas o sistema Clevenger é o mais conhecido e bastante utilizado em escala laboratorial, podendo operar em circuito aberto ou fechado.

2.7 Hidrodestilação

A hidrodestilação simple ou destilação com água consiste em mergulhar diretamente o material vegetal tratado em água, para depois submeter à ebulição. Neste método a ação de água sobre o material é máxima, por isso pode se apresentar hidrolises ou oxidações. Este método é útil para materiais que possuem folhas pequenas ou medianas. É preferível colocar a água já quente para diminuir a hidrolises e o tempo de operação. Os vapores heterogêneos condensam-se e o aceite essencial vai separar por diferença de densidade (ALBERDAN *et al.*, 2004).

2.8 Emulsões

Uma emulsão se dá quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, nessas condições existe a tendência para um dos líquidos tornarem-se disperso no outro, na forma de glóbulos finitos, desde que haja alguma força mecânica atuando. Mas quando retirada esta força, os dois líquidos puros irão se separar. Chama-se emulsão aos sistemas que assim persistem por um período de tempo razoável (poucos segundos a vários anos) (BURGUERA, 2012). É mais interessante para muitas aplicações que a emulsão possua estabilidade por um longo período; outras vezes, é necessário reduzir sua estabilidade para que sejam “quebradas” em alguns processos dinâmicos, onde as mesmas causam problemas (Figura 3). Uma emulsão possui duas fases, a fase dispersa é chamada fase interna e a fase contínua é chamada fase externa. São usualmente referidas como sistemas óleo/água (O/A) quando a fase interna não é a água, sendo esta a fase contínua (Figura 5). O inverso é o sistema água/óleo (A/O), deixando claro que nesta linguagem considera-se “óleo” praticamente todos os líquidos hidrofóbicos não polares e “água” os líquidos hidrofílicos altamente polares (WATSON, 2011). A princípio, as fases óleo e água seriam compostas de apenas de uma substância mais cada uma das fases costuma conter vários “componentes”. Existe também outro tipo de emulsões chamadas emulsões múltiplas, são sistemas designados emulsões de emulsões. Nestes sistemas, as gotículas da fase dispersa também contêm gotículas menores dispersas dentro delas. Estas emulsões podem ser de dois tipos:

a) Emulsões água em óleo em água (A/O/A), nas quais a fase interna, oleosa, possui gotículas de água dispersas em seu interior.

b) Emulsões óleo em água em óleo (O/A/O), nas quais a fase interna, aquosa, possui gotículas de óleo dispersas em seu interior.

Os recentes avanços no campo crescente de nanoemulsões estão abrindo novas aplicações em muitas áreas, tais como produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos (FRYD & MASON, 2012).

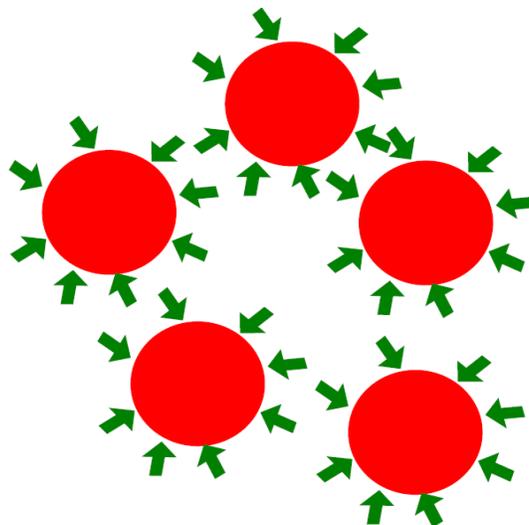


Figura 3- Emulsão de um líquido disperso em outro. O dispersante é um tensoativo, um polímero ou um pó que apresenta propriedades de um e outro componente.

2.8.1 Classificação de emulsões e ação dos surfactantes

O tamanho da partícula interna pode variar se o sistema é termodinamicamente instável à medida que a fase interna tenta constantemente se aglomerar e se separar como uma segunda fase. Para evitar isto agentes emulsificantes são usados para retardar essa separação inevitável (BURGUERA, 2012). A viscosidade da emulsão e sua aparência são controladas em parte pelo tamanho das partículas da fase dispersa e a proporção entre as fases internas e externas. Quando o tamanho das partículas da fase dispersa diminui, a emulsão muda de um branco leitoso para transparente (microemulsão). Se as partículas são maiores do que 500 nm a emulsão é branco

leitoso e esta impressão visual é devida ao espalhamento de luz consequência dos diferentes índices de refração do meio dispersado e o dispersante (fase contínua) (BURGUERA, 2012).

Quando a tensão interfacial diminui, as partículas dispersas também se tornam muito pequenas e temos a formação das microemulsões (Figura 4), a partir daqui a formação e estabilidade são compreendidas considerando a formação de interfaces com tensão muito baixa, a ponto de se conseguir a estabilidade termodinâmica do sistema bifásico. A formação de muitas partículas pequenas (ao invés de menos partículas, grandes) causa um grande aumento na entropia e, portanto uma redução na energia livre. Este aumento de entropia é mais do que suficiente para compensar o aumento (menor) da energia livre causado pelo aumento de área, desde que a tensão interfacial seja muito pequena (WATSON, 2011).

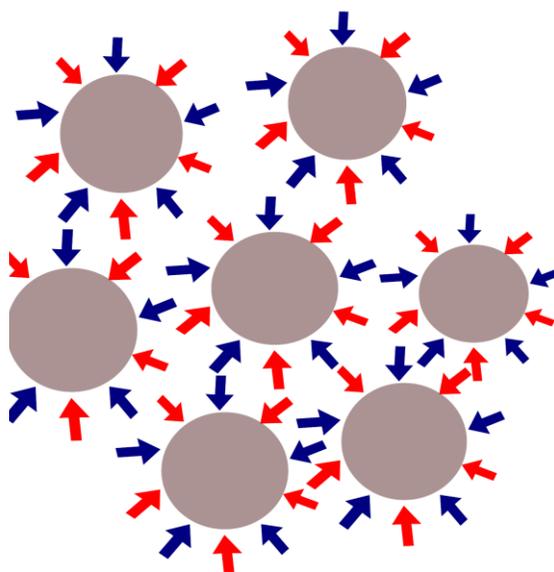


Figura 4. Representação de microemulsões, gotículas muito pequenas de uma fase são dispersas na outra, por uma mistura de tensoativos.

Uma vez que o tipo de fase externa foi especificado, o próximo passo é dividir as emulsões em 3 classes (Tabela 2) baseadas na porcentagem de volume ou proporção em volume fase interna. Esta classificação é importante, pois o volume de fase interna tem profunda influência nas propriedades da emulsão.

Tabela 2. As seis maiores classes de emulsões.

Grupo	Porcentagem de volume de fase interna (IPR)		
	< 30%	30 a 74%	>74%

Água em óleo	Baixo IPR a/o	Médio IPR a/o	Alto IPR a/o
Óleo em água	Baixo IPR o/a	Médio IPR o/a	Alto IPR o/a

2.8.1.2 < 30% de volume de fase interna

As esferas individuais não interferem uma nas outras e a propriedade do sistema é determinada primariamente pelas propriedades da fase externa. À medida que a porcentagem de volume de fase interna aumenta, as gotas começam a colidir mais freqüentemente e a interferir umas nas outras. Isso causa um aumento aparente, que é lento, na viscosidade de todo o sistema.

2.8.1.3 A partir de 30% de volume de fase interna

Esferas uniformes num arranjo cúbico. Acima dessa concentração, as partículas são obrigadas a um contato mais próximo e a formulação apresenta viscosidade relativamente alta e um comportamento de fluido não newtoniano.

2.8.1.4 A partir de 74% de volume de fase interna

Outro empacotamento é alcançado. Geralmente não é estável, a não ser com a utilização de sistemas emulsificantes especiais. A maioria dos sistemas emulsificantes perde eficácia e a partir desse ponto ocorre inversão da emulsão.

2.8.2 Microemulsões

As microemulsões (ME) são geralmente caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å, (SILVA, *et al.*, 2013). Apesar da denominação “micro”, o sistema envolve gotículas com tamanhos suficientemente pequenos para ser opticamente transparente. Além dos agregados esféricos, outros tipos de estruturas

internas, como as bicontínuas e bicontínuas tubulares foram demonstrados (ACOSTA, *et al.*, 2009). As ME são, de forma geral, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (ZHOU, *et al.*, 2011). Do ponto de vista farmacêutico, as ME podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (Figura 5).

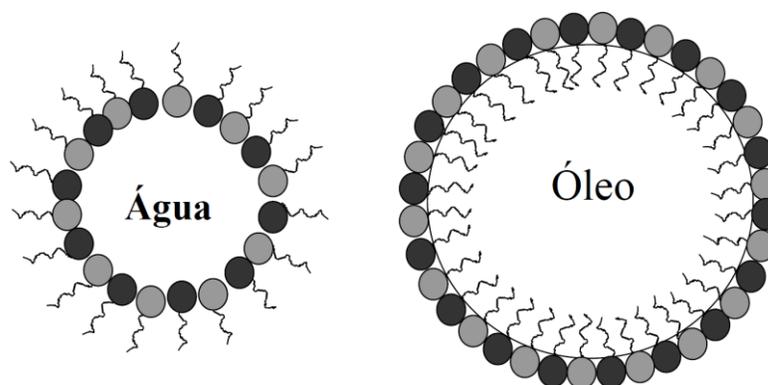


Figura 5. Estrutura das microemulsões, adaptado de Gomes de Oliveira, 2004.

2.8.3 Nanoemulsões

Nanoemulsões, também conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas, consistem em emulsões muito finas com glóbulos de diâmetros na faixa de 50 a 100 nm (DE COMPOS *et al.*, 2012) ou 50 a 300 nm (DELMAS *et al.*, 2011). Segundo (MCCLEMENTS, 2011) as nanoemulsões apresentam aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm e aparência leitosa quando este se encontra entre 200 e 500 nm (Figura 6).

As nanoemulsões, ao contrário de microemulsões, exigem quantidades não excessivas de tensoativos, na faixa de 5 a 10%. O tamanho reduzido das partículas permite a deposição uniforme nos substratos. São sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não iônicos e/ou polímeros na preparação. Isso acontece devido ao pequeno tamanho

de glóbulo, que proporciona grande redução na força de gravidade superada pelo movimento browniano (MCCLEMENTS, 2012).

	Aparência	Denominação	Aspecto
2 – 20 μm		Macroemulsão	Branca leitosa
0,1 – 0,3 μm		Nanoemulsão	Branca azulada
< 0,1 μm		Microemulsão	Translúcida
0,01 μm		Soluções miscelares	Transparentes
0,001 μm		Soluções moleculares	Transparentes

Figura 6. Escala de granulometria das emulsões adaptado de (ANSEL, 1999).

2.8.3.1 Métodos de obtenção das nanoemulsões

Ao trabalhar com nanoemulsões se deve ter em consideração que elas não se formam espontaneamente, se faz necessário o uso de aparelhos que possam entregar energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta energia de emulsificação ou por métodos que utilizam baixa energia (PEY *et al.*, 2006).

2.8.3.2 Métodos que utilizam alta energia de emulsificação

As nanoemulsões obtidas através do uso de homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores têm sido muito descritas na literatura (EL-DIN *et al.*, 2013). De maneira geral, a preparação de nanoemulsões através desses procedimentos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa as fases, oleosa e aquosa, são aquecidas separadamente e emulsionadas através do uso de homogenizador de alta rotação.

A emulsão obtida na primeira etapa apresenta um tamanho de gotícula submicrométrico (entre 500 e 1000 nm), influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após o resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através de homogenizadores de alta pressão (LEE, 2013). Os homogenizadores de alta pressão consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positivo a qual injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em uma válvula homogeneizadora (MAO *et al.*, 2010). Fatores como temperatura, viscosidade e concentração da fase interna das emulsões influenciam nas características físico-químicas do produto final e a otimização das condições operacionais deve ser realizada para cada sistema desenvolvido e tipo de equipamento utilizado (KARADAG *et al.*, 2013). O uso de ultrassom para a preparação de nanoemulsões também tem sido descrito por vários autores (JAVADI *et al.*, 2012).

Geralmente o fluido é primeiramente conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina, e a vibração desta produz ondas ultrassônicas, que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de tamanho reduzido (KHARISSOVA *et al.*, 2012). Os principais parâmetros que envolvem este procedimento de homogeneização são as propriedades interfaciais da emulsão, que podem ser controladas pela natureza e concentração dos tensoativos e pelas propriedades do óleo, em especial a tensão superficial e a viscosidade (DORDEVIC *et al.*, 2013). O uso de homogeneizadores e ultrassom podem conduzir à obtenção de nanoemulsões de propriedades físico-químicas equivalentes através da otimização das condições operacionais e da composição qualitativa e quantitativa das formulações.

2.9 Potencial zeta

O potencial zeta (ZP) é uma função da carga de superfície que se desenvolve quando todo o material é colocado em um líquido. É um índice muito bom da magnitude da interação eletrostática entre partículas repulsivas. O ZP é comumente usado para prever e controlar a

estabilidade de dispersão. As características da interface de sólido-líquido pode influenciar também, a adesão, flutuação e, em mais sistemas concentradas, o comportamento reológico. Determinações ZP confiáveis são, portanto, de interesse prático para a maioria das indústrias, incluindo a preparação de cerâmica, processamento e aplicação (ZHANG, *et al.*, 2007).

As medidas baseiam-se na carga superficial da partícula em análise, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio, e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, que se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas, e com a estabilidade da suspensão. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, e essa força supera a tendência natural à agregação. O valor ideal deve ser maior ou igual a +/- 30 mV.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Realizar a caracterização Físico-Química, cromatográfica, espectroscópica do óleo essencial da *Croton Cajucara* Benth, produzir um sistema nanoemulsionado; e realizar experimentos para verificação das atividades biológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o óleo essencial da folha da espécie *Croton Cajucara* Benth (OECC).
- Estudar as propriedades físico-químicas, espectroscópicas (UV-Vis, FTIR), cromatográfica (CG-MS) do OECC.
- Obter um sistema nanoemulsionado do OECCn.
- Estudar, com o emprego de técnicas farmacológicas *in vivo* os efeitos biológicos das atividades antinociceptivas do OECC e OECCn.
- Comparar a diferença nos efeitos biológicos para o óleo essencial e o sistema nanoemulsionado da CCB *in vivo*.

Capítulo 4

MATERIAL E METODOS

MATERIAL

4.1 Coleta das folhas

As folhas da espécie *Croton Cajucara* Benth (CCB) foram coletadas na rodovia BR 364, km 13, Rua Projetada 1113. Coordenadas: -10.012552 latitude e -67.707780 longitude, nas proximidades da Embrapa, Rio Branco, Acre. A coleta das folhas foi feita no período do mês de julho (Figura 7). Foi realizado um registro da espécie CCB (exsicata) no laboratório de Botânica da UFAC, com número do tombo CCB: 4459. O cultivo da espécie CCB no Brasil é feito em solo classificado como latossolo amarelo, argiloso, considerado profundo, ácido, com boa porosidade, drenagem boa, porém quimicamente pobre em nutrientes (VIEIRA, *et al.*, 2010). O clima da região de cultivo é quente e úmido, caracterizado por pluviosidade em torno de 2.937 mm anuais, umidade relativa média de 89 % e temperatura média anual de 27.8 °C.



Figura 7. Coleta do material botânico *Croton Cajucara* Benth (CCB).
Foto- Jason J. Atoche

4.2. Balança eletrônica de precisão

Para pesar as folhas da planta usamos a balança eletrônica de precisão marca Quimis modelo 510-1500, com visor de cristal líquido e indicador de estabilidade da leitura, indicador de capacidade utilizada, carga máxima de 1500 g, sensibilidade 0.05 g, reprodutibilidade 0.1, campo de tara 1000 g, tempo de estabilização 4 s.

4.2.1 Processador

Usamos um processador marca Britânica, com três velocidades, de aço inoxidável. Para a trituração das folhas secas, depois de permanecer numa estufa de secagem durante 8 horas.

4.2.2 Secador convectivo de bandejas

Usamos um secador convectivo de bandejas com circulação de ar, modelo Q0316M4, a temperatura e tempo controlado, com duas bandejas de tela de aço inoxidável (Figura 8).



Figura 8. Secagem do material botânico.
Foto- Jason J. Atoche.

4.2.3 Aparelho clevenger

Foi utilizado um aparelho tipo Clevenger modificado, junto com um balão de fundo chato de 5.000 mL e uma manta aquecedora para a obtenção do óleo essencial da *Croton Cajucara Benth* (Figura 9).



Figura 9. Sistema clevenger modificado para extração de óleo essencial.
Foto- Jason J. Atoche

4.2.4 Cálculo do rendimento (%) do óleo essencial da *Croton Cajucara Benth*

O rendimento médio de óleo essencial foi calculado em base seca, utilizando-se a seguinte equação para o cálculo do rendimento:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{volume do óleo essencial (mL)}}{\text{massa do material vegetal (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

METODOS

4.3 Seleção do material botânico

As folhas foram selecionadas e lavadas, retirando as partes danificadas, e a poeira das folhas e posteriormente procedeu-se a colocar as folhas selecionadas na estufa a temperatura de 40 °C até a secagem uniforme (Figura 10).



Figura10. Folhas selecionadas da espécie *Croton Cajucara* Benth.
Foto- Jason J. Atoche

4.3.1 Extração do óleo essencial da *Croton Cajucara* Benth

A extração foi realizada no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC, através do método da hidrodestilação, com o uso de aparelho tipo Clevenger modificado. Utilizaram-se para cada extração amostras de 200 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo chato de 5.000 mL, sendo adicionados 2,5 litros de água destilada até a imersão das folhas trituradas, em seguida foi iniciado o processo de extração do óleo essencial. O processo de extração foi realizado com um tempo de duração de 4 horas. Ao final da

extração foi feita a medição do volume do óleo essencial no mesmo aparelho clevenger (Figura 11), para em seguida ser armazenado em vidro âmbar com tampa para evitar a oxidação fotoquímica dos combustíveis voláteis e colocado em freezer para posterior análise.

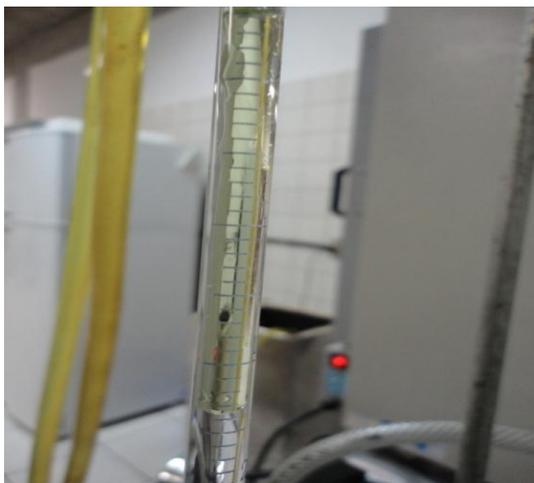


Figura 11. Equipamento Clevenger para extração do OECC.
Foto- Jason J. Atoche

4.4 Análises Físico-Químicas do óleo essencial da *Croton Cajucara Benth*

4.4.1 Índice de refração

O índice de refração do OECC foi determinado com a utilização de um refratômetro de bancada Abbé (Figura 12), ajustado com água destilada. Tal procedimento foi realizado à temperatura de 40 °C. Previamente se introduz uma corrente de água destilada no equipamento, de forma que circulasse através do aparelho até a estabilidade da temperatura desejada (40 °C). Após a estabilização, foram colocadas três gotas da amostra entre os prismas, realizando-se a leitura na escala, obtendo-se o índice de refração absoluto.



Figura 12. Refratômetro de bancada Abbé.
Foto- Jason J. Atoche

4.4.2 Medida da densidade do óleo essencial

A densidade (D) de uma substância é a razão entre a massa e o volume da substância e foi realizada usando a relação conhecida que envolve os fatores de massa (m) por volume ocupado (V) da equação (2), para tal fim utilizou-se uma balança de precisão de marca Shimadzu (Figura 14).

$$D = \frac{\text{Massa (g)}}{\text{Volume (mL)}} \quad (2)$$

4.4.3 Medida do índice de saponificação

O índice de saponificação foi calculado, primeiro pesando numa balança analítica 1,5902 g do OECC, depois com ajuda de uma pipeta volumétrica foi preparada uma solução de hidróxido de potássio de 25 mL de 0.5 Molar a mesma que foi adicionada à amostra de óleo essencial, paralelamente foi feita uma determinação em branco (duplicata) a mesma foi colocada sob-refluxo apenas a solução de KOH para finalmente deixar a amostra em refluxo por 4 horas a saponificação completa. Depois deste tempo se retirou a amostra do aquecimento e foi

adicionado duas gotas de solução de fenolftaleína 1%, seguidamente utilizou-se a solução de HCl 0.5 Molar como titulante na bureta e começou-se a gotejar a solução na amostra ainda quente até a coloração rosa desaparecer totalmente (Figura 13). Todo este processo foi realizado por triplicata seguindo a metodologia de (COIMBRA & NEUZA, 2012). Para quantificar o índice de saponificação foi usada a equação (3) (FARMACOPEDIA, 1988).

$$I.S = \frac{V_x F_x 28}{P} \quad (3)$$

Onde:

V é o volume de base gasto na titulação.

F é o fator de correção do hidróxido de sódio 0.01 Molar.

P é a massa em gramas da amostra utilizada.



Figura 13. Fenolftaleína usada na titulação do OECC.
Foto- Jason J. Atoche

4.4.4 Medida do pH

O valor do pH do OECC foi medido utilizando papel tornassol, depois de ter coletado a amostra, utilizou-se uma pequena quantidade que foi gotejada sobre o papel tornassol e aguardou-se alguns segundos para realizar a comparação com os valores indicados na tabela que vem indicada no mesmo conteúdo (Figura 14). A experiência foi realizada por triplicata para confirmar nossos resultados seguindo a metodologia de (CHAIYANA *et al.*, 2010).



Figura 14. Papel tornasol utilizado para medir o valor do pH.
Foto- Jason J. Atoche

4.5 Análises espectroscópicas do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara* Benth

4.5.1 UV-VIS

Tomando como referencia o estudo realizado por (RISTIC *et al.*, 2007), onde analisou por espectroscopia UV-VIS óleos essenciais, fizemos diluições do OECC com hexano (solvente pouco polar), para diferentes concentrações 2,4,6,8,10,12% de OE. Utilizando um equipamento da QUIMIS modelo Q798U2M, (Figura 15) do Laboratório de Bioprospecção e Síntese de Nanocompostos da Universidade Federal do Acre (UFAC), antes de realizar as medições se procedeu a calibrar o equipamento, com a curva padrão, neste caso utilizou-se cubetas de quartzo pelo espectro considerado para as amostras que foram de 200 até 800 nm. Seguidamente começou-se a realizar as medições do espectro e ploteo do gráfico para cada valor obtido.



Figura 15. Espectrofotômetro UV-VIS usado para medições da amostra de OE.
Foto- Jason J. Atoche.

4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Seguindo o trabalho realizado por (BARDAKCI *et al.*, 2009), os espectros de FT-IR foram obtidos no modo de transmissão em um espectrômetro Thermo modelo Nicolet 380 Smart Multi Bounce Hatr. A amostra do OECC foi colocada a modo de preencher completamente o espaço onde tem um prisma de cristal como acessório e foi realizada a medição trabalhando na faixa do espectro de luz Infravermelho médio entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Além disso, realizou-se uma medida de referência, onde o prisma de cristal (ZnSe) estava vazio, para servir de referência, comumente conhecido como “background”, esta medida será considerada na hora do apresentar o espectro (Figura 16).



Figura 16. FT-IR usado para verificar os grupos funcionais do OE.
Foto- Jason J. Atoche.

A espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) foi usada para caracterizar o OECC, assim como para verificar os grupos funcionais presentes no OECC. As medidas de espectroscopia Infravermelhas foram realizadas no laboratório da Polícia Federal do Estado do Acre e na UNESP utilizando o acessório de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).

4.6 Análises cromatográfico do OECC

4.6.1 Cromatografia gasosa acoplada a massa (CG-MS)

As análises espectroscópicas gasosa acoplada a massa dos OECC foram realizadas no Laboratório da Polícia Federal do Acre e na UNESP, seguindo o trabalho realizado por (MOTTA *et al.*, 2011), com as seguintes condições de análise empregando um sistema para Cromatografia Gasosa acoplado a massa Agilent Technologies 7890 A (Figura 17), utilizando coluna de sílica capilar apolar DB-1 (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.10 µm espessura do filme) com dimetilpolisiloxano como fase estacionária e hélio como gás de arraste com um fluxo constante de (1 mL x min⁻¹). O volume de injeção foi de (1 µL) foi colocada em modo split (1:20) com tempo de corte de 4 minutos. Os injetores de interface e as temperaturas do detector foram mantidos a 280 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi inicialmente programada em 50 °C por 3 minutos com um aumento de 2 °C min⁻¹. Finalmente, a temperatura foi mantida constante por 10 minutos, completando 133 minutos do total da análise.



Figura 17. CG-MS usado para identificar os possíveis componentes do OE.
Foto- Jason J. Atoche

4.7 Preparo das Nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos - UFAC, para tal se considerou o método de sonicação por alta energia usada por (ABBAS, *et al.*, 2013). Usou-se água destilada, OECC, e como tensoativo foi usado Polissorbato 80 (Tween® 80), INCI name: Polysorbate 80 (Figura 20) fabricante Brenntag. O valor de equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL: 4.3), apresenta características não iônicas. O método de obtenção da nanoemulsão através do diagrama ternário foi descrito inicialmente por (COMELLES *et al.*,1989; TREGUIER *et al.*,1975). O diagrama ternário (Figura 18) é representado no plano como triângulo equilátero, onde a composição dos três constituintes é simétrica. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: óleo, água e tensoativo. O vértice superior representa 100% do óleo, o inferior direito representa 100 % do tensoativo e o inferior esquerdo representa 100% da fase aquosa. Foram realizadas duas tentativas para obter um estado de nanoemulsão, conforme Tabelas 3 e 4.

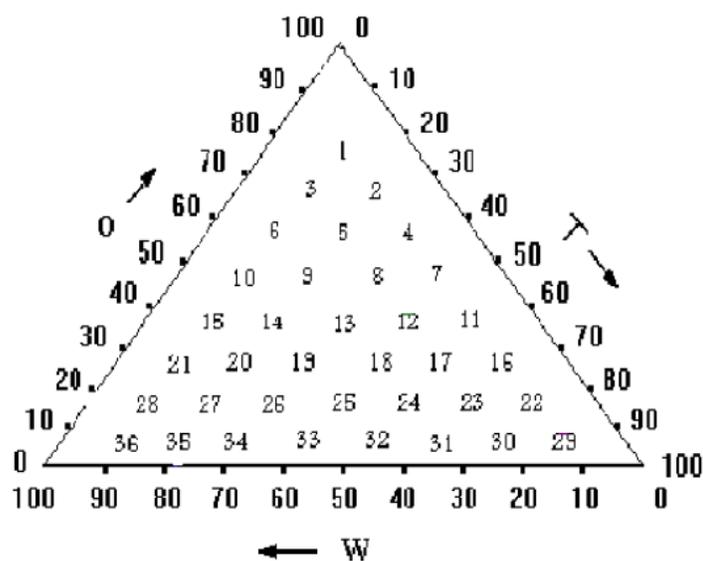


Figura 18. Representação do diagrama ternário (ZANATTA, 2008).

Tabela 3 – Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário.

	Tween 80%	Óleo%	Água%	Tween 80 (g)	Óleo (g)	Água (g)	Peso total (5 g)
amostra 1	2.5	5	92.5	0.125	0.25	4.625	5
amostra 2	2.5	10	87.5	0.125	0.5	4.375	5
amostra 3	2.5	20	77.5	0.125	1	3.875	5
amostra 4	5	5	90	0.25	0.25	4.5	5
amostra 5	5	10	85	0.25	0.5	4.25	5
amostra 6	5	20	75	0.25	1	3.75	5
amostra 7	7.5	5	87.5	0.375	0.25	4.375	5

Tabela 4 – Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário

	Tween 80%	Óleo%	Água%	Tween 80(g)	Óleo (g)	Água (g)	Peso total (5g)
amostra 1	10	5	85	0.5	0.25	4.25	5
amostra 2	10	10	80	0.5	0.5	4	5
amostra 3	10	20	70	0.5	1	3.5	5
amostra 4	12.5	5	82.5	0.625	0.25	4.125	5
amostra 5	12.5	10	77.5	0.625	0.5	3.875	5
amostra 6	12.5	20	67.5	0.625	1	3.375	5
amostra 7	15	5	80	0.75	0.25	4	5

4.7.1 Obtenção das nanoemulsões

O OECCn foi preparado pelo método de alta energia, para um sistema óleo/água (O/A), onde a fase aquosa, constituída da água destilada, óleo essencial da *Croton Cajucara Benth*, e o sistema tensoativo Polissorbato 80 (tween 80), realizamos primeiro uma pre-emulsão e dissolvendo-se o surfactante misturado na fase aquosa e depois se misturando na fase oleosa.

A solução foi colocada dentro do equipamento sonificador de marca Sonoplus Bandelin UW 2070 e mantendo em contato direto a ponta do aparelho com a solução, usando uma potencia de 60 watts (Figura 19), para 5 ciclos de processamento de 5 minutos cada um deles, refrigerando o sistema com um banho de gelo para reduzir o aquecimento e desta forma evitar alterações em nossos resultados (SOLANS, 2005).



Figura19. Formação da nanoemulsão de OECC usando método de alta energia no aparelho sonificador.
Foto- Jason J. Atoche

4.7.2 Avaliações da estabilidade da nanoemulsão

Para a avaliação da estabilidade da nanoemulsão foi considerado o trabalho realizado por (SILVA, *et al.*, 2011). A estabilidade desta nanoemulsão o/a foi avaliada por meio do monitoramento do tamanho e da distribuição de tamanho das partículas em função do tempo. Os tempos usados neste estudo foram: ao término do preparo da emulsão (tempo 0), e após 1, 2, 24, 48, 72 h e, assim sucessivamente, até a observação visual da completa estabilização do sistema. Adicionalmente ao término da obtenção da nanoemulsão foram observadas em algumas delas, o óleo residual no fundo do recipiente da amostra, mostrando uma baixa estabilidade das emulsões formadas, estas apresentavam uma concentração do óleo ligeiramente inferior à concentração inicial de entrada no equipamento. Este comportamento foi principalmente observado para as dispersões preparadas com o óleo essencial na concentração de fase oleosa diferente de 5%, e por este motivo, não foram consideradas as análises de distribuição de tamanho de partículas destas dispersões (KOURNIATIS *et al.*, 2010). A nanoemulsão produzida foi caracterizada utilizando o analisador de tamanho de partículas Zetasizer da Universidade Federal de Rio Grande do Norte UFRN, Laboratório de Farmacologia, a fim de se obter a distribuição do tamanho das gotas

dispersas na nanoemulsão, bem como a sua distribuição de tamanho e dispersão. Este equipamento apresentou o detector em uma posição a 173° do feixe de luz incidente, sendo conhecida como detecção por retroespalhamento, tecnologia patenteada conhecida como NIBS (retroespalhamento não invasivo).

4.8 Testes biológicos *in vivo*

4.8.1 Investigação da atividade antinociceptiva

Neste estudo foram utilizados camundongos Swiss albinos de ambos os sexos, pesando entre 30 e 40 g, os animais foram provenientes da superintendência do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária no Acre, e depois mantidos na sala de quarentena do Laboratório de pesquisas em fisiofarmacologia da Universidade Federal do Acre – UFAC, com ciclo “claro-escuro” 12/12h em gabinete biotério com água e ração *ad libitum*, em sala especial climatizada a temperatura de 22 a 25 °C. Os experimentos desenvolvidos foram conduzidos de acordo com orientações e considerações éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (CARBONE, *et al.*, 2012) e a luz das normas de acordo com o comitê de ética do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ceará (UECE). Para todos os grupos experimentais foi adotado um n = 8 animais (4 fêmeas e 4 machos).

As drogas (ferramentas farmacológicas e OECC e OECCn, foram sempre diluídas em água destilada obedecendo às doses preconizadas para o estudo e de acordo com o peso corporal dos animais. O OECC (30, 100 e 300 mg/kg) administrado por *via* oral (v.o.); o ácido acético, aplicado *via* intraperitoneal (ip.); a carragenina, aplicada na região sub-plantar dos animais por *via* intraplantar; a indometacina, aplicada por *via* oral; e a morfina aplicada *via* subcutânea (s.c.)

4.8.2 Determinação da toxicidade aguda

Nos experimentos de toxicidade foi usado o mesmo padrão de animais e critérios preconizados para os demais experimentos, sendo aqui adotadas as doses de 30, 100, 300, 500,

1000, 2000 e 3000 mg/kg de OECC em água destilada, v.o. Todos os grupos foram observados intensivamente durante os primeiros 120 minutos após a administração dos compostos substância em estudo em intervalos regulares de 12 horas, durante 72 horas. Os parâmetros comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, micção, diarreia, convulsão, coma e morte.

4.8.3 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (writhing test)

Esse teste visa a determinação da atividade analgésica periférica. A metodologia utilizada foi conforme a descrição de MISHRA *et al.* (2010) para camundongos. No teste das contrações abdominais induzidas pelo ácido acético os animais eram tratados previamente com OECC em grupos distintos 1 hora antes da injúria tecidual dada pela injeção de ácido acético 0.8% (v/v), ip. na dose de 0,1 mL/10g peso corporal. Dez minutos após o estímulo, era feita a contagem do número de contorções, durante 20 minutos.

4.8.4 Teste da placa quente (Hot Plate)

Tal teste objetiva a determinação da atividade analgésica central (YU, *et al.*, 2012). Durante o teste os camundongos eram colocados sobre a superfície aquecida ($53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em seguida registrados os tempos em que os animais manifestaram respostas. Um dia antes do experimento era realizado um pré-teste, sendo considerados aptos os animais que permaneciam sobre a placa aquecida de 8 até 16 segundos sem esboçar reações devido ao estímulo termonociceptivo. Um tempo de corte de 20 segundos foi adotado para prevenir possíveis danos teciduais. As observações das reações características eram feitas sistematicamente nos tempos preconizados: 0, 60, 120, 180 e 240 minutos. O grupo de animais controle positivo recebia doses de morfina (dose de 0,01 ml a cada 20 g do peso no animal, s.c.) e o de animais controle negativo recebia apenas água destilada, v.o. No dia do experimento os animais recebiam o tratamento 1 hora antes de serem colocados sobre a placa aquecida, onde eram observados os tempos em que esboçavam as reações características do teste (ato de saltar ou ato de lambem as patas).

4.8.5 Medida do desempenho motor (teste do Rota Rod)

A fim de avaliar os possíveis efeitos musculares ou sedativos do OECC foi avaliado o desempenho motor dos animais no teste de Rota Rod, realizado conforme o protocolo seguido por CAVALCANTE *et al.*, (2012). Um dia antes do experimento, os animais eram selecionados através de um pré-teste, sendo considerados aptos os que permaneciam sem cair do cilindro rotatório do aparelho por 2 períodos consecutivos de 60 segundos. O Rota Rod consiste em um cilindro subdividido com 4 compartimentos. O cilindro girava a uma velocidade constante de 18 rotações por minuto. No dia do experimento os animais eram tratados com OECC, uma hora antes de serem submetidos ao teste. O resultado foi expresso com o parâmetro tempo de permanência, em segundos, que os animais permaneceram sem cair do cilindro. O tempo máximo de permanência preconizado é de 60 segundos, com uma recondução pelo mesmo tempo, após o qual o animal era retirado. Era então observada a permanência de todos os animais e comparadas à permanência média dos grupos.

4.8.6 Edema de pata induzido pela carragenina

A indução do edema pela carragenina foi realizada conforme descrito por GARCIA, *et al.*, (2010). Nesse teste os animais eram pré-tratados com OECC 1 hora antes de receberem a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) nas patas traseiras direitas. O volume (em mL) da pata foi determinado em um Pletismômetro (aparelho específico para o teste) nos tempos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos. Como controle positivo foi utilizada a indometacina (10 mg/kg) enquanto o grupo de animais controle negativo recebia apenas igual volume de água destilada/kg de peso. O edema era mensurado em suas variações de volume da pata entre os vários tempos após o estímulo e o tempo zero, imediatamente após a administração do agente flogístico.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth*

Depois de extraído o óleo essencial de cada amostra, foi calculado o rendimento médio, em base da folha seca, do *Croton Cajucara Benth* conforme se mostra na Tabela 5.

O rendimento médio do OECC foi de 0.8%, verificando neste caso o resultado encontrado por a bibliografia MENDOÇA *et al.*(2008) , que relatam valores similares (0.84%), em quanto ao porcentagem do rendimento.

Tabela 5. Teor de OE de CCB, determinado em base seca.

Massa da folha seca (g)	Teor do OE (mL)	Valor do rendimento %
200	1.7	0.85
200	1.5	0.75
200	1.7	0.85
200	1.4	0.7
200	1.7	0.85
200	1.6	0.8
200	1.6	0.8
Valor da media do Rendimento do OE		0.8

O trabalho feito por BELTRAME *et al.*(2010), menciona que a localização onde é coletada a espécie pode influenciar as características do óleo essencial, este argumento, foi considerado em nossa pesquisa mantendo as características de estudo na amostra. O rendimento normalmente é afetado por diversos fatores, incluindo a espécie vegetal considerada, as partes utilizadas e metodologia empregada no processo de extração, variações fisiológicas inerentes à planta (fase de desenvolvimento, ciclo de polinização, variações sazonais, condições de estresse da planta), condições ambientais (clima, poluição atmosférica, características do solo).

5.2 Caracterização Físico-Química

5.2.1 Índice de refração

O resultado da avaliação do índice de refração do OECC apresenta como resultado o valor de 1.63, este resultado significa quanto à luz que incide na amostra vai ser desviada quando atinge nela. Este resultado obtido é característico em substâncias oleosas. Comumente encontramos nos constituintes dos óleos essenciais duas classes químicas diferentes, os terpenoides e fenilpropanoides. Embora que os terpenos representem a maioria dos componentes e ocorram com muito mais frequência e abundância, sempre que os fenilpropanóides estão presentes fornecem sabor e odor indispensáveis e significativos ao óleo, mas biogeneticamente tanto os terpenoides e fenilpropanoides originam-se de metabolitos diferentes e são gerados por rotas biossintéticas completamente diferentes (SANGWAN *et al.*, 2001).

5.2.2 Medida da densidade

Medida da densidade usando a equação (2) o valor de densidade do OECC foi de 0.75 g/mL. Este resultado é característico dos óleos que apresentam menor densidade que a água.

$$\frac{1.5 \text{ (g)}}{2 \text{ (mL)}} = 0.75 \text{ g/mL}$$

O resultado encontrado sugere que a série terpênica apresenta densidade inferior à da água, conforma propriedade químicas das substâncias aromáticas (óleo essenciais), que possuem odor característico além de ser solúveis em álcool e em solventes orgânicos e muito pouco solúveis em água.

5.2.3 Índice de saponificação

Os resultados para o índice de saponificação do OECC realizados usando a equação (3) foi feita em triplicata, mostrado na Tabela 6:

Tabela 6. Índice de saponificação para o OE da CCB.

Analise	V (gasto na titulação) (mL)	Constante	f- fator de correção	M- Massa da amostra (g)	IS
1	18	28.05	1.014	1.5902	321.37
2	20	28.05	1.014	1.5902	357.08
3	19	28.05	1.014	1.5902	339.23
Média I.S					339.22

O valor encontrado para o índice de saponificação está acima do valor máximo preconizado pelas normas legais (FAO/OMS, 1986; ANVISA, 2005), que é de 250 mgKOH/g. Tendo em consideração que o índice de saponificação é uma medida que avalia o tamanho da cadeia dos ácidos graxos que compõem o material lipídico, indicando que quanto menor o peso molecular do ácido graxo, tanto maior será o índice de saponificação apresentado na amostra analisada.

$$I.S = \frac{V_x F_x 28}{P} \quad (3)$$

5.2.4 Medida do pH

A medida do pH para o OECC, apresentou um valor neutro (pH=7), o valor encontrado é uma características que garante as aplicações em testes *in vivo*, por ser biocompatível.

5.3 Medidas espectroscópicas

5.3.1 Espectroscopia UV-VIS

A análise do espectro de absorvância UV-VIS foi realizada a partir dos resultados obtidos na Figura 20, que apresentou baixa absorvância do OECC para o espectro compreendido no comprimento de onda de 200 a 800 nm, para concentrações de 2, 4, 6, 8, 10,12%. Nossa amostra composta de OECC tem majoritariamente entre seus componentes terpenoides (α -pinene, α -terpeniol, linalol, entre outros), alguns deles apresentam baixa absorvância no espectro UV-VIS para as concentrações de 2 e 4% para um comprimento de onda de 240 até 250 nm respectivamente, para as outras concentrações a absorvância da amostra apresentou valor nulo. O resultado do trabalho feito por (MARTINEZ, 2003), onde a análise espectroscópica UV-VIS realizado em óleos essenciais cujos componentes foram terpenoides, mostraram também baixa ou nula absorvância para o comprimento de onda 254 nm

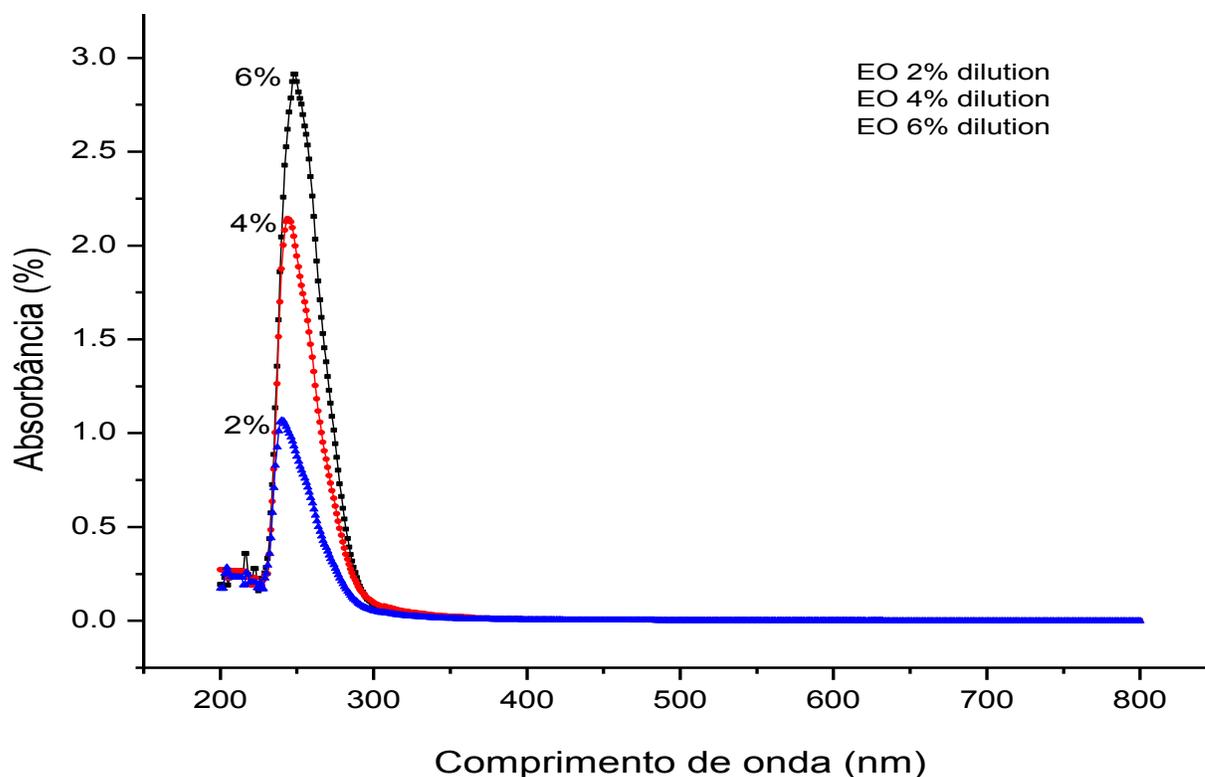


Figura 20. Espectro de absorvância UV-VIS para OECC.

5.3.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (TF-IR)

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi usada para caracterizar a amostra do OECC, a análise dos grupos funcionais evidenciou a existência do componente linalol, no espectro infravermelho para esta estrutura, (Figura 21).

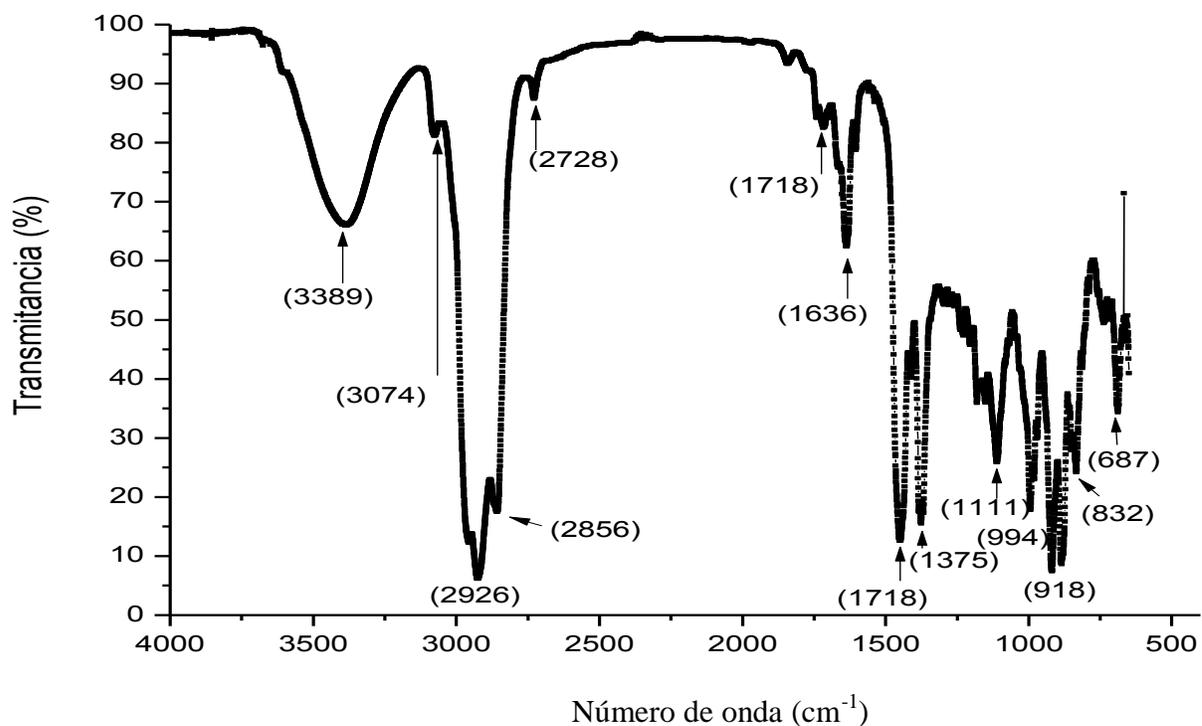


Figura 21. Espectro de TF-IR para a amostra de OECC.

O espectro de infravermelho da amostra (Figura 22) do OECC apresentou bandas de absorção para diferentes comprimentos de onda, vibrações características de modo, (estiramento simétrico O-H, deformação angular C-O), os mesmos apresentam concordância com os dados obtidos por (SÁ SOBRINHO *et al.*, 1998).

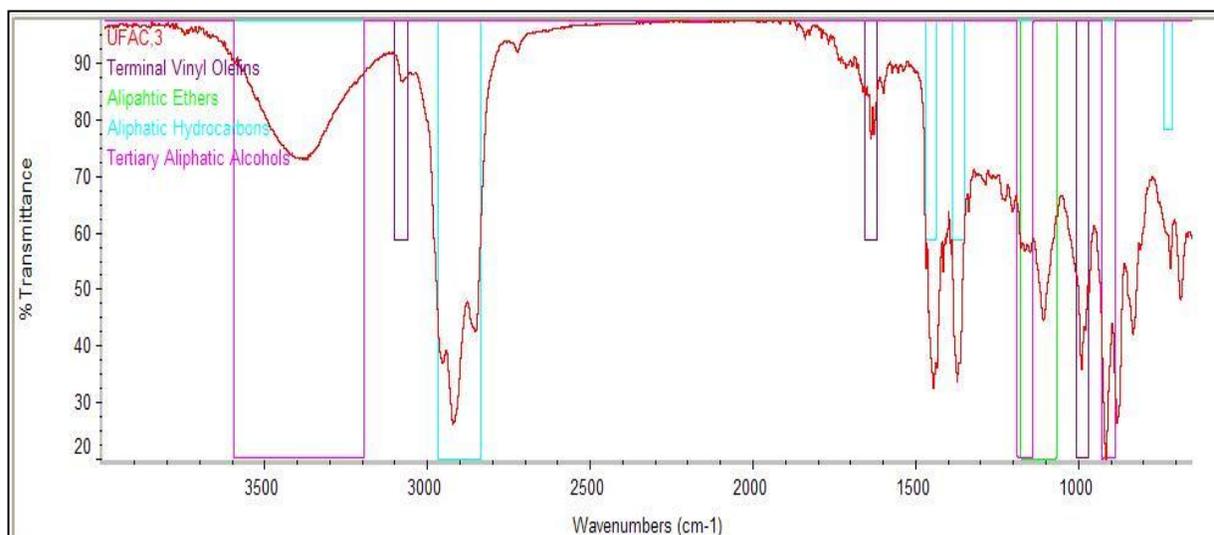


Figura 22. Espectro de TF-IR para a amostra OECC, mostrando os grupos funcionais.

A verificação dos picos apresentados no espectro de transmitância é representada na Tabela 8.

Tabela 8. Bandas de absorção para os picos encontrados.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
918	Deformação angular C-C
1111	Deformação angular terciária C-O
1375	Deformação angular Doblete
1449	Estiramento simétrico CH ₃
1636	Alqueno C=C
2856	Alcano C-H
2926	Alcano C-H

O espectro do infravermelho (Figura 21) da amostra de OECC evidenciou uma banda larga em 3389 cm⁻¹ que é características do grupo funcional hidroxila O-H. A banda observada em 830 cm⁻¹ é associada ao estiramento simétrico do grupo funcional Alcano C-C. A presença dos grupos alcoóis alifáticos é confirmada pelas bandas entre 918 – 994 cm⁻¹ mostrada no espectro. A banda observada em 3385 cm⁻¹ sugere um estiramento no grupo funcional O-H. A banda em 1636 cm⁻¹ é atribuída a deformação da ligação H-O-H conforme encontrado no trabalho feito por (SANDASI *et al.*, 2011).

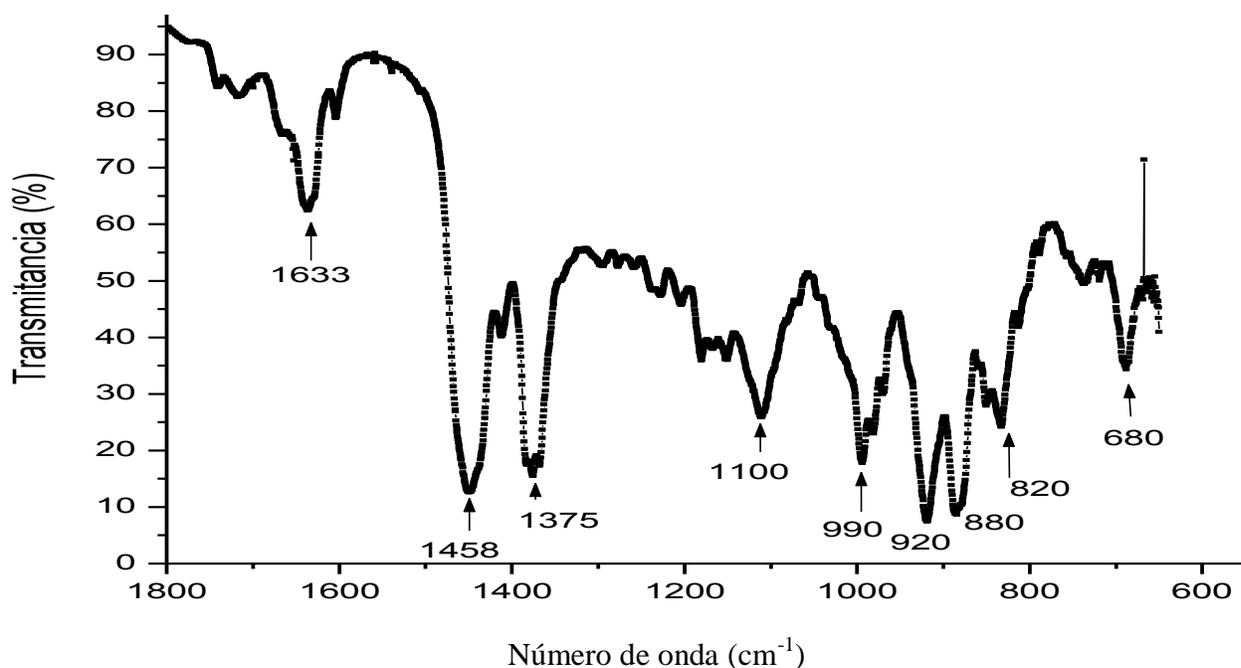


Figura 23. Espectroscopia TF-IR região finger print do OECC.

Uma inspeção mais próxima da impressão digital região ($1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) mostrou bandas principais características para os padrões (Figura 23). Os espectros dos padrões demonstram poucas diferenças que podem ser atribuídos aos grupos funcionais únicos. O espectro dos grupos carboxilas foi predominante forte na banda de 1636 cm^{-1} . A banda longa pode ser devido ao estiramento vibracional do grupo carboxila ($\text{C}=\text{O}$), que acontece na maioria dos espectros de absorção intensos. A banda para 1636 cm^{-1} pode ser atribuída para o grupo funcional dos alcoóis ($\text{C}=\text{C}$). A intensidade variável das bandas poderia ser devido ao número de ligações alcanos, a posição nas moléculas e a influência dos grupos vizinhos na estrutura. A região abaixo de 1500 cm^{-1} forma um número de sinais características entre os terpenos. As bandas são devido aos estiramentos e uma ampla variedade de ligações vibracionais, as ligações C-H que variam em intensidade e estão relacionadas às vibrações dos grupos dos alcanos geralmente estão apresentadas entre $1375\text{ - }1458\text{ cm}^{-1}$. Embaixo dos 1400 cm^{-1} encontram-se as ligações que podem ser devido às ligações vibracionais metil CH_3 . Para a banda 920 cm^{-1} devido às vibrações do grupo hidroxila, para o valor entre $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ foi observada a zona fora da região finger print a vibração do grupo funcional alcoóis (BOMBARDA *et al.*, 2008).

5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa CG-MS

Na Tabela 7, estão apresentadas as substâncias maioritaria encontradas no OECC na sua maioria, compostos por sesquiterpenos e monoterpenos formando um total de 47 componentes. O espectro cromatográfico do OECC apresenta grupos funcionais de substâncias em regiões diferentes, cada uma delas está presente para um tempo de retenção indicado na figura 28. Na fração absorvida se observa a presença de sesquiterpenos bicíclicos (β -carofileno), monoterpenos monocíclicos (α -pineno), monoterpenos acíclicos em quantidade majoritária, (Linalol, Figura 24), sesquiterpenos (Trans nerolidol), entre outros compostos em menor proporção.

Tabela 7. Porcentagem em massa dos componentes majoritários do OECC.

Tem. Ret. (min)	Área (mm²)	Altura(mm)	Massa %	Nome	Fórmula
32,976	845'387,827	83'202,418	22.15	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O
39,630	7'716,616	1'228,969	0.20	α - pineno	C ₁₀ H ₁₆
57,605	482256013	56353854	12.64	β - cariofileno	C ₁₅ H ₂₄
58,113	96'710,730	13'559,764	2.53	Nafthaleno	C ₁₀ H ₈
65,104	8'167,009	1'074,297	0.21	Ciclohexanometanol	C ₆ H ₁₁ CH ₂ OH
65,971	475655356	58643189	12.46	Transnerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O

Estes resultados estão em concordância com o trabalho desenvolvido por (SIMÕES, 2003), cujos componentes foram encontrados em OECC. Segundo ARAÚJO *et al.*(1971), o óleo essencial das partes aéreas da OECC mostrou-se rico em linalol confirmando nossa pesquisa.

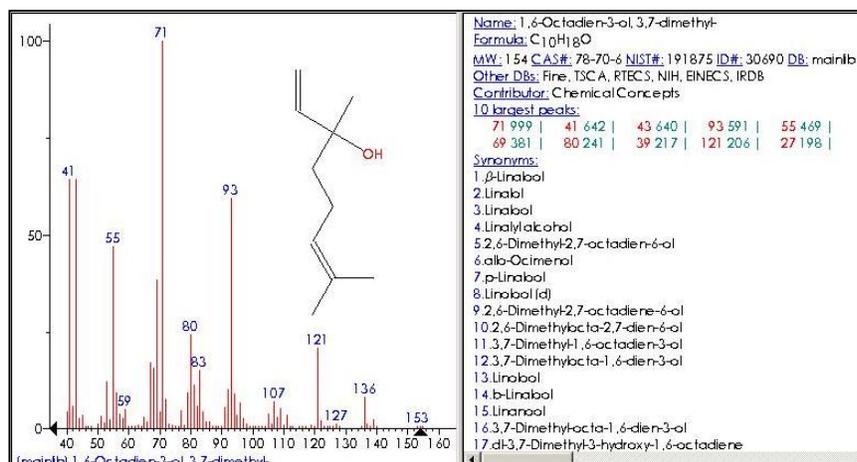


Figura 24. O linalol como componente majoritário identificada pelo software do equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Observa-se através da Figura 25 os compostos constituintes do OECC, identificados com segurança com o uso de CG-MS juntamente, com o índice de retenção linear.

As concentrações das substâncias foram calculadas a partir das áreas dos picos da cromatografia gasosa e organizadas por ordem de eluição da cromatografia gasosa, além das análises dos picos obtidos conferindo dados da bibliografia.

Nos trabalhos feitos por BRUNETON (2001) e SALATINO *et al.* (2007), revelaram os componentes do OECC tais como monoterpene (linalol), sesquiterpenos (cariofileno) e fenilpropanoides como eugenol.

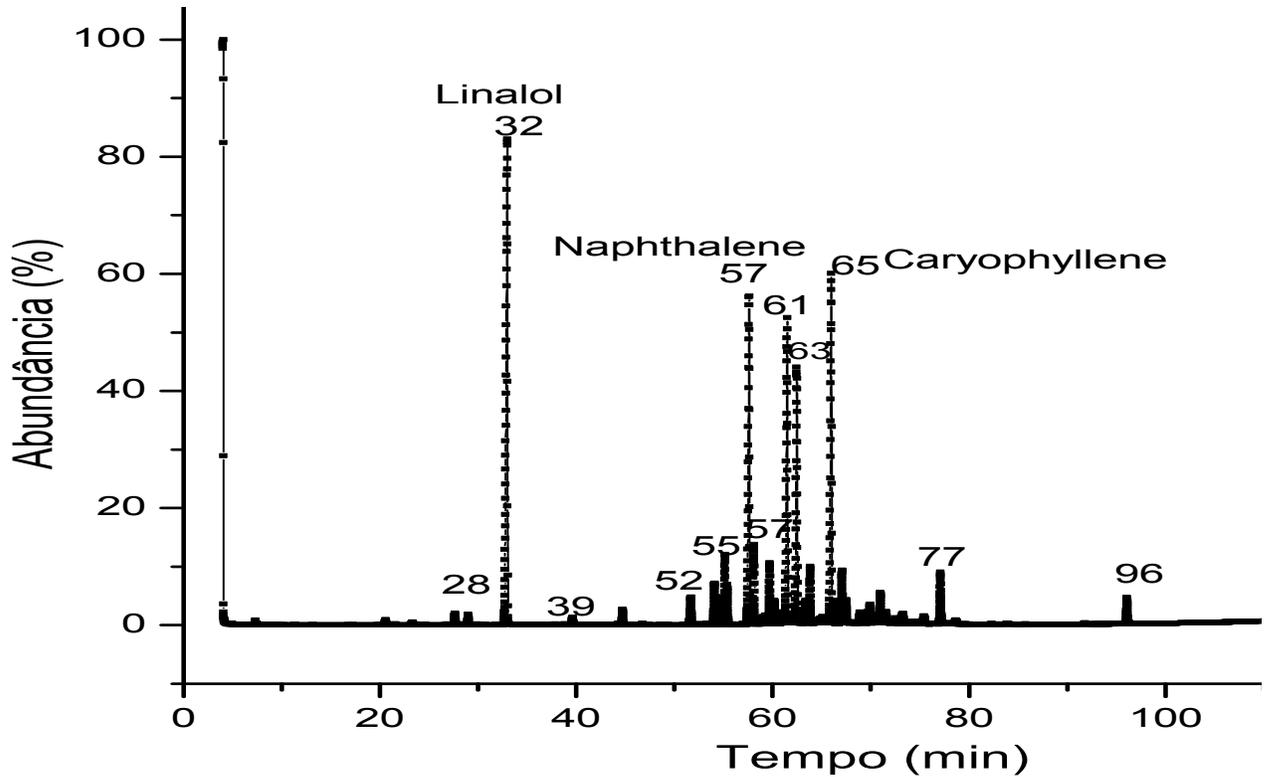


Figura 25. Cromatografia gasosa acoplada à massa CG-MS do OECC.

5.4 Nanoemulsões

Depois de realizado o procedimento descrito, obtivesse o sistema nanoemulsionado (Figura 26). Este pequeno tamanho das gotas confere sua estabilidade, evitando a sedimentação (cremeação). Após o repouso, as dispersões foram avaliadas visualmente, sendo observado que para as menores concentrações do OECC foi onde se conseguiu o sistema nanoemulsionado estável.

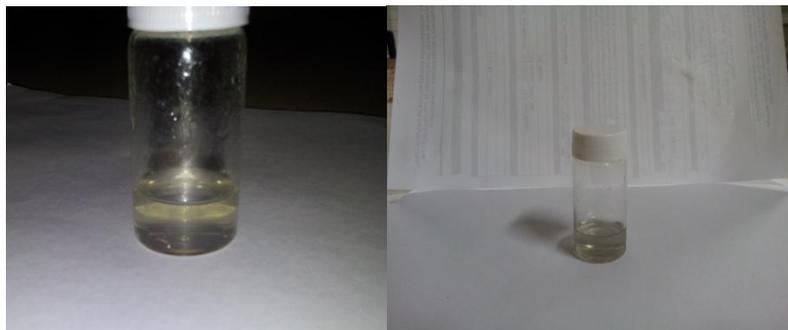


Figura 26. Sistema nanoemulsionado com OE de CCB.
Foto- Jason J. Atoche.

5.4.1 Potencial Zeta

A repulsão eletrostática das partículas coloidais é chave para a compreensão da estabilidade de qualquer dispersão. A medida da mobilidade electroforética, mesmo em solventes não polares, fornece informações valiosas. As características da superfície do óleo essencial foram estudas através de curvas de potencial zeta usando PALS (Phase Analysis Light Scattering) da nanoemulsão (Figura 27). O estudo da curva do potencial zeta da nanoemulsão de OECC permitiu a medir a estabilidade da suspensão além de fornecer informações sobre o diâmetro das partículas a estabilidade da suspensão em água. Os altos valores de potencial zeta indicaram uma maior estabilidade da suspensão. Trabalhos similares usando nanoemulsões de OEs encontraram resultados similares de estabilidade (BALAKUMAR, *et al.*, 2013).

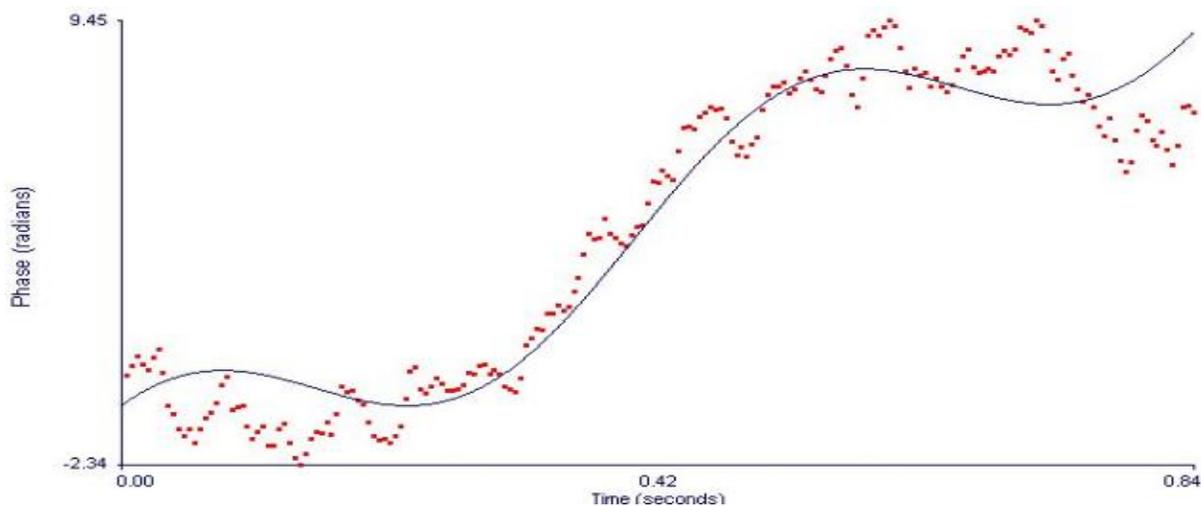


Figura 27. Fase da medição do potencial zeta realizada na nanoemulsão do OECC.

A nanoemulsão apresenta cargas em sua superfície, que ajuda a manter a repulsão em solução aquosa entre elas, por repulsão eletrostática. O método desenvolvido para conseguir a nanoemulsão faz uso do surfactante não iônico Tween 80, para obter um sistema cineticamente estável e com um tamanho de gota pequeno é essencial para aplicações nos testes biológicos, além de considerar o valor do HLB (15) do surfactante não iônico Tween 80, o que define o caráter hidrofílico/lipofílico do surfactante, a fim de proporcionar melhor correspondência com um determinado óleo e produzir uma maior estabilidade da nanoemulsão. O diâmetro médio foi calculado a partir da intensidade, a massa e o número de distribuição bimodal.

Geralmente, o efeito do tamanho é devido à interação significativa entre as partículas coloidais, quando as partículas são menores que 50 nm (AJAY & ACHINTA, 2012). O resultado foi um tamanho médio do diâmetro das gotículas da nanoemulsão de 35 nm (Figura 28). Seguindo o trabalho feito por SALVIA-TRUJILLO *et al.* (2013), usando nanoemulsão de óleos essenciais de lemon grass, encontrou diâmetro media das gotículas abaixo de 35 nm.

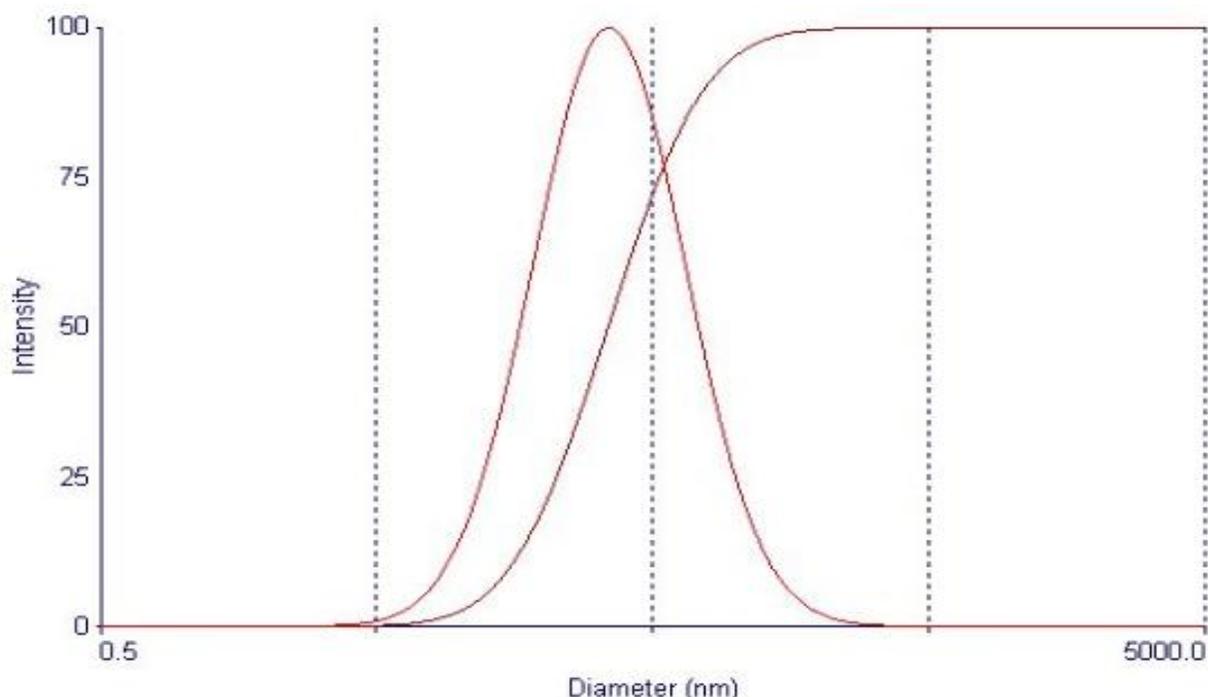


Figura 28. Fase da medição do potencial zeta realizada em nanoemulsão do OECC.

5.5 Testes biológicos com óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth*

Estudos sobre comportamento da dor em laboratórios geralmente utilizam ratos e camundongos. Os métodos usados em nossa pesquisa são direcionados especialmente para a detecção de diferentes modalidades de dor através da variação dos tipos de estímulos, sua localização ou intensidade (DA ROCHA *et al.*, 2013). No presente estudo se buscou a verificação do efeito antinociceptivo do OECC, utilizando modelos de nocicepção térmica (teste da placa quente) e química (testes das contorções abdominais e edema induzido na pata). Adicionalmente foi avaliada a influencia sobre a atividade motora (teste do Rota Rod).

O trabalho desenvolvido por CANUTO (2005) demonstrou a atividade antinociceptiva e antiedematogênica do óleo essencial da espécie *Croton Argyrophyloides*.

5.5.1 Toxicidade aguda do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth*

O OECC até a dose de 3 g/kg de peso animal não produziu alterações no comportamento dos animais, não alterou os padrões fisiológicos de evacuação e micção e não foram observadas mortes durante o período de setenta e duas horas. Nenhuma dessas alterações também foi observada quando foi utilizado a nanoemulsão do óleo. Assim, é possível afirmar a baixa toxicidade do OECC, uma vez que não causou morte ou alteração no comportamento dos animais testados. Essa observação se torna relevante quando comparada com outros estudos disponíveis na literatura científica acerca da toxicidade dos óleos essenciais, inclusive de outras espécies do próprio gênero *Croton*. A espécie *Croton argyrophyloides* também apresenta baixa toxicidade (MOTA *et al.*, 2012).

Para os estudos biológicos com OECC foi seguido o trabalho feito por PRIETO e LOURDES (2013), onde foi feito um sistema nanoemulsionado O/A utilizando para isso o surfactante bicompatível Tween 80

5.5.2 Efeito do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth* sobre as contorções abdominais em camundongos induzidas por ácido acético.

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético não é um modelo específico, pois este teste é sensível à avaliação de drogas analgésicas, no entanto, pode ser visto como um modelo geral, não seletivo, para estudos de drogas antinociceptivas, mas as contorções involuntárias do abdômen podem ser de interesse devido a sua similaridade com algumas das dores viscerais conhecidas e, através desses testes, pode-se identificar drogas com efeito antinociceptivo, especialmente aquelas de ação periférica (LE BARS *et al.*, 2001; ADEBIYI *et al.*, 2006).

Vários estudos demonstraram que o ácido acético promove a liberação de substâncias endógenas (cininas, prostanóides, óxido nítrico, substância P, TNF- α , IL-1 β e IL-8) pelos mastócitos e macrófagos residentes na cavidade peritoneal, os quais estimulam os neurônios sensoriais primários e induzem a resposta comportamental típica caracterizada pela contorção abdominal dos animais. A injeção intraperitoneal do ácido acético induz o aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal (IKEDA *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2003).

A Figura 29 apresenta os resultados do efeito do OECC no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. O OECC apresentou atividade antinociceptiva promovendo inibição significativa do número de contorções abdominais, alcançando uma redução de até 50.6 % em relação ao grupo controle. O trabalho realizado por KHAN, *et al.*, (2009), também usando OECC, apresentou resultados similares ao deste estudo. Para o caso de OECCn apenas na dose de 300 mg/kg de peso, o OECCn foi capaz de inibir, muito fracamente, as contorções abdominais induzidas por ácido acético, demonstrando portanto uma fraca atividade antinociceptiva (Figura 30).

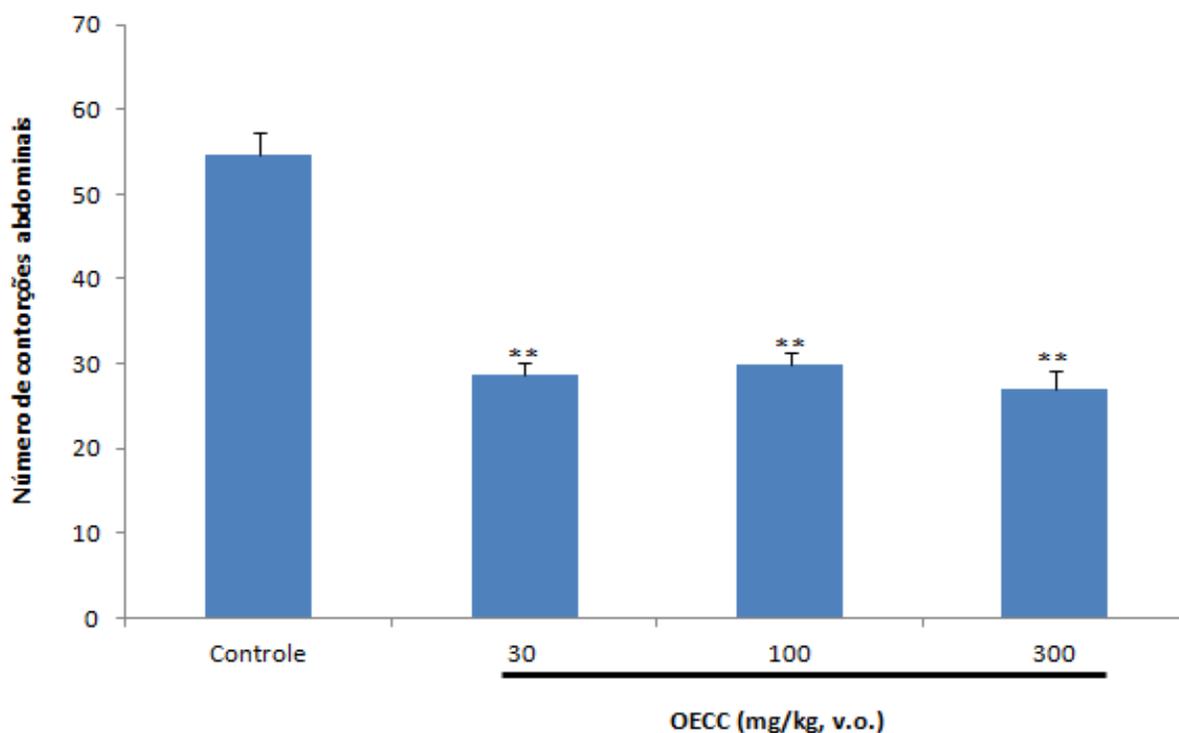


Figura 29. Efeito inibitório da administração prévia do OECC sobre as contorções abdominais de camundongos induzidas pela injeção intraperitoneal do ácido acético 0.8 %. As barras representam as médias \pm epm e **p<0.01.

No estudo realizado por TAKAKI *et al.* (2008), usando a espécie *Ginger, Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae)*, que possui o linalol entre seus componentes majoritários, foi verificado efeito antinociceptivo do óleo essencial da espécie do gênero *Rosmarinus*.

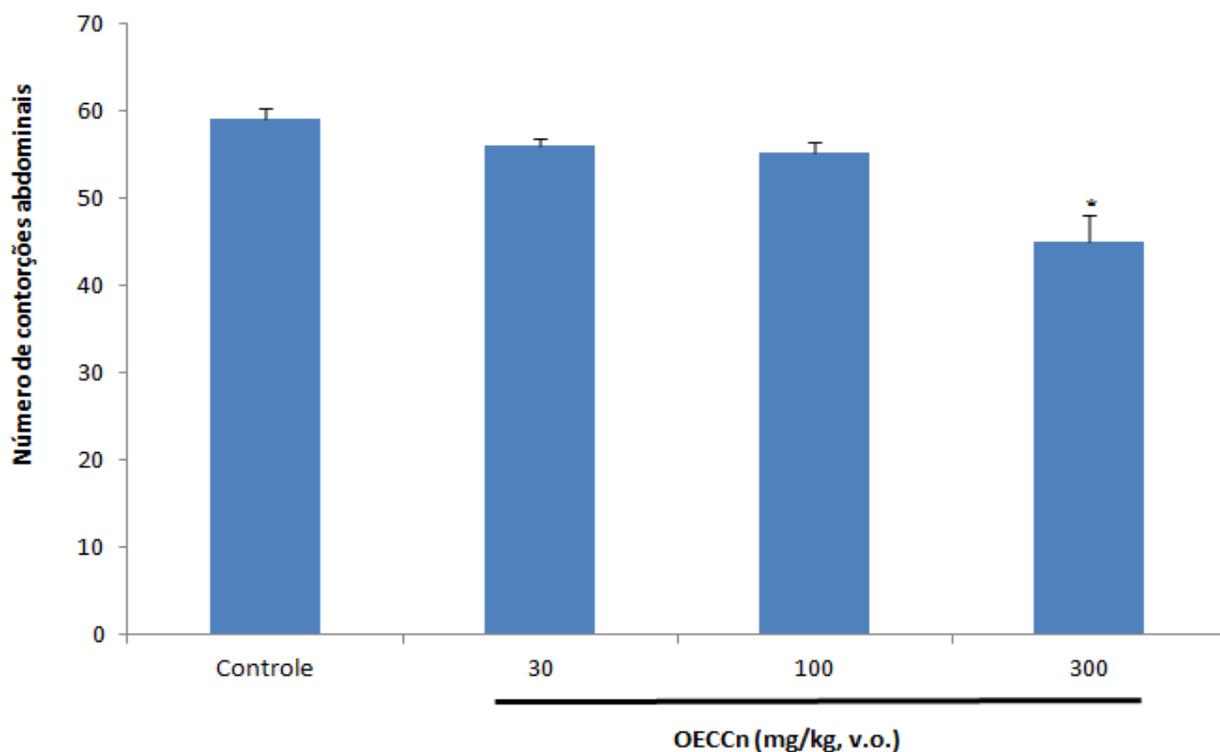


Figura 30. Efeito inibitório da administração prévia do OECCn sobre as contorções abdominais de camundongos induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0.8 %. As barras representam as médias±epm de n=8 e (*) p<0.05.

5.5.3 Efeitos da espécie *Croton Cajucara Benth* sobre a nocicepção térmica em placa quente em as patas de camundongos

Na tentativa de elucidar a presença ou não da ação analgésica central em nível cerebral, foi realizado o teste clássico da placa quente, ensaio largamente empregado para testar drogas analgésicas que interferem na nocicepção através do sistema nervoso central, como os opióides (VENANCIO *et al.*, 2011), através de mecanismos de integração espinhal e supra-espinhal, uma vez que o ato de saltar e o de lambem a pata são considerados os critérios de resposta (TAHERIAN *et al.*, 2012) considerados nessa via quando aplicado esses tipos de teste. O

modelo da placa quente caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores (fibras C e A Delta). As fibras nociceptoras são ativadas após a ativação dos receptores vanilóides, que são responsáveis pela resposta ao aumento da temperatura (PURVES et al, 2010).

Conforme aos dados apresentados (Figura 31), observa-se que não houve diferença entre o tempo de reação ao estímulo térmico por elevação da temperatura sob as patas dos camundongos, dos grupos de animais tratados com OECC e o grupo de animais controle que receberam apenas água destilada.

Nessa prova considerada um teste sensível a fármacos que atuam em nível supraespinal de modulação da resposta dolorosa, o OECCn (Figura 32), também não promoveu alterações no comportamento dos animais sobre a placa aquecida quando comparados com aqueles não tratados. Diferentemente, o trabalho de BAROCELLI *et al.*(2004), mostrou aumento no tempo de reação dos animais tratados com óleo essencial de *Lavandula hybrida* Reverchon, no qual o linalol encontrava-se entre os componentes majoritários. Já os estudos realizados por EIDI *et al.* (2011), também apresentaram aumento apenas moderado no tempo de latência dos animais tratados com óleo essencial do extrato etanólico de *Salvia syriaca*.

Considerando os resultados deste teste, junto aos obtidos na prova das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, tem-se indicio de que o OECC tenha apresentado alguma atividade antinociceptiva apenas em nível local.

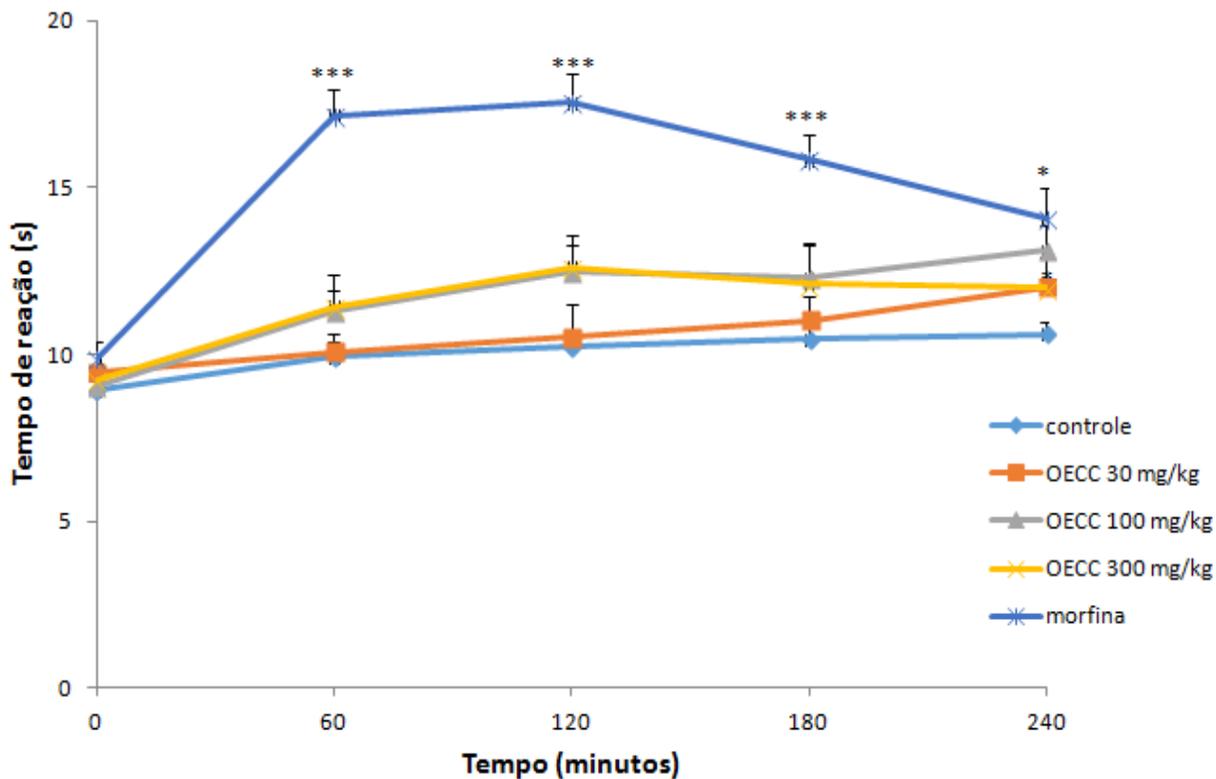


Figura 31. Efeito antinociceptivo da administração prévia do OECC sobre a nocicepção térmica induzida, em patas de camundongos submetidos ao teste da placa quente. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001.

O efeito dos componentes do OECC parece não envolver diretamente a ativação dos receptores opióides, diferentemente dos resultados que apresenta a morfina usada neste teste.

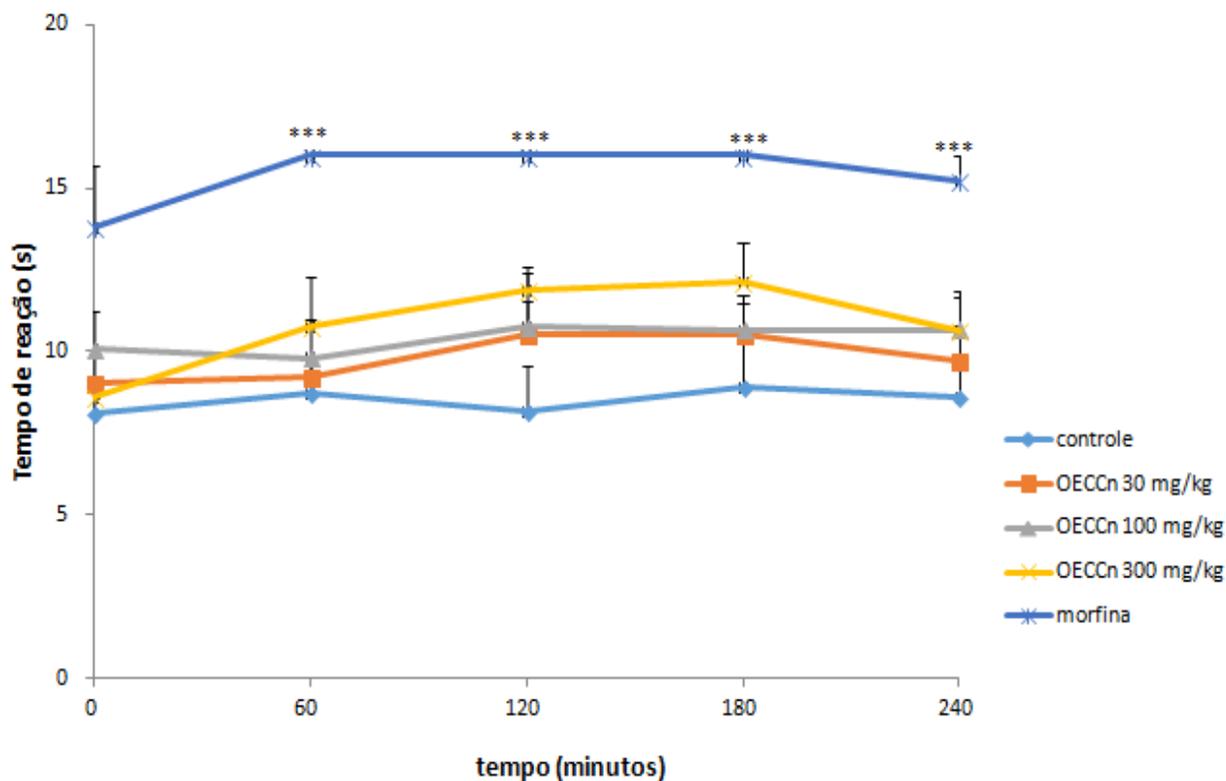


Figura 32. Efeito antinociceptivo da administração prévia do OECCn sobre a nocicepção térmica induzida, em patas de camundongos submetidos ao teste da placa quente. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001.

5.5.4 Efeitos da administração oral da espécie *Croton Cajucara Benth* sobre a performance motora de camundongos submetidos ao Rota Rod

Um indicador para descarte de substâncias analgésicas é a alteração no desempenho motor produzidas por algumas substâncias, que pode ser erroneamente avaliada como ação analgésica, uma vez que a maioria dos modelos experimentais utilizados avalia uma alteração no comportamento motor (elevação da pata, lambidas nas patas, retirada da pata, contorções) produzindo resultados falso-positivos. Sendo assim, a maior fonte de erros em estudos sobre substâncias que interferem na transmissão nociceptiva tanto periféricamente como centralmente é a modificação no desempenho motor do animal (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). No teste do Rota Rod se avalia a atividade motora dos camundongos e, conseqüentemente, se as possíveis

atividades antinociceptivas observadas poderiam estar relacionadas a efeitos inespecíficos da substância no sistema nervoso central ou periférico. Nas doses adotadas nos tratamentos com OECC, não se observou alterações significativas sobre o desempenho motor dos animais submetidos ao aparelho de acordo com as os parâmetros tomados no teste. Não foram detectadas diferenças significativas quanto ao tempo de permanência, comparando-se os animais tratados com os do grupo controle sobre a barra giratória do aparelho (Figura 33). Estes resultados ratificam os estudos obtidos com óleo essencial das folhas da espécie *Croton Cajucara* Benth, realizados por SANTOS *et al.* (2005). Para o estudo com OECCn (Figura 34), os resultados não foram diferente daqueles encontrados com o OECC.

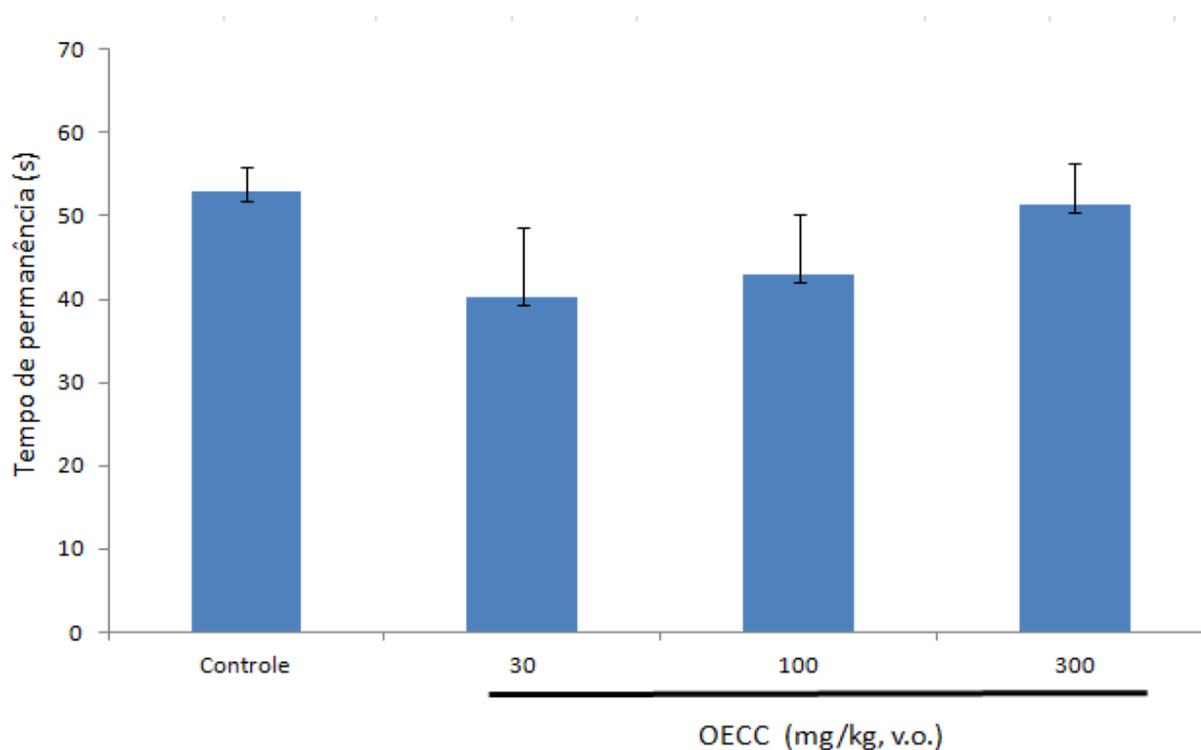


Figura 33. Efeito da administração prévia do OECC sobre o desempenho motor de camundongos submetidos ao teste do Rota Rod. As barras representam as médias \pm epm de n=8.

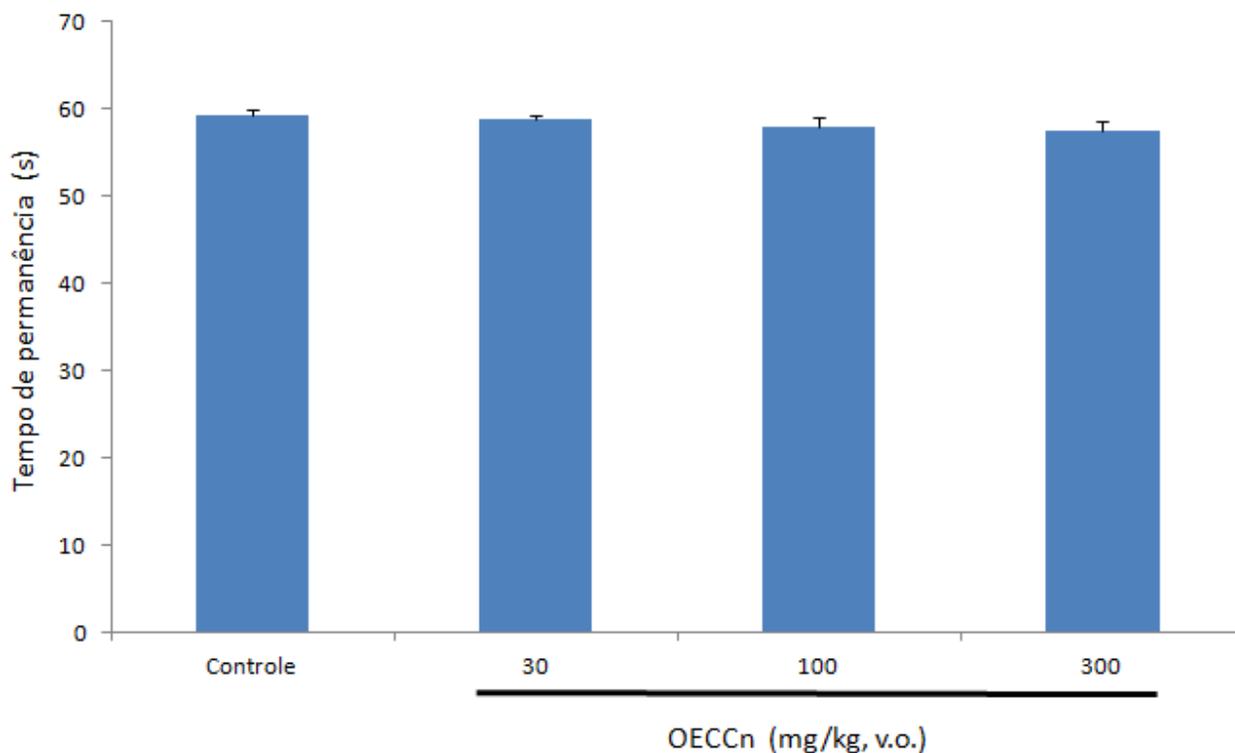


Figura 34. Efeito da administração prévia do OECCn sobre o desempenho motor de camundongos submetidos ao teste do Rota Rod. As barras representam as médias \pm epm de n=8.

5.5.5 Efeito da espécie *Croton Cajucara* Benth sobre o edema induzido por carragenina em patas de camundongos

A injeção intraplantar de carragenina resulta em uma resposta inflamatória caracterizada pelo aparecimento do edema de pata tempo-dependente, infiltração de neutrófilos, aumento nos níveis de diversos mediadores no exudato da pata e pelo desenvolvimento de hiperalgesia a estímulos térmicos e mecânicos (MORRIS, 2003). O edema induzido por carragenina possui duas fases: a fase inicial (0-1h), mediada pela liberação de histamina e serotonina e caracterizada por um infiltrado celular difuso, com predominância de neutrófilos polimorfos nucleares; a segunda fase (após 1h), mediada pela liberação de prostaglandinas e bradicinina e caracterizada por um infiltrado composto por macrófagos, eosinófilos e, predominantemente, linfócitos; a continuidade entre as duas fases é mediada por cininas (GOYAL *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que a

carragenina induz uma liberação periférica de óxido nítrico (NO), produção esta mediada por NOSn na fase inicial e pela NOSn e NOSi na fase tardia (BROCK & TONUSSI, 2008).

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado derivado de *Chondrus crispus*, uma espécie de alga marinha, que produz efeitos pró-inflamatórios altamente reproduzíveis na indução do edema de pata em animais experimentais, além de não promover efeitos colaterais de natureza sistêmica e utilizadas neste modelo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). A injeção intraplantar de carragenina em camundongos provoca uma reação inflamatória, sendo um método apropriado para a busca de novos agentes antiinflamatórios.

O edema de pata induzido por carragenina é muito usado como modelo experimental *in vivo* para a avaliação do potencial antiinflamatório de extratos de plantas medicinais, sendo um modelo padrão para a avaliação de inflamação aguda (PERIANAYAGAM *et al.*, 2006). Esse modelo é muito sensível à ação de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (MORRIS, 2003).

No modelo usado, a indometacina, antiinflamatório de natureza não esteroidal, que age na *via* da degradação do ácido araquidônico, injetada (10 mg/kg, ip.), foi utilizada como controle positivo e foi capaz de bloquear o aparecimento do edema ($p < 0.001$). Já a administração v.o., prévia de OECC, que é constituído majoritariamente por linalol, alfa-pineno e beta-cariofileno (Tabela 7), inibiu apenas discretamente o edema induzido de pata pela carragenina, sugerindo a existência de discreta atividade antiinflamatória (Figura 35). Resultados semelhantes a esta pesquisa, foram apresentados por ABDON, *et al.*, (2002), quando usou OE do gênero *Croton nepetaefolius*. Segundo o trabalho feito por FERNANDES *et al.*, (2007), encontrou atividade antinociceptiva antiinflamatória usando a espécie *Cordia Verbenacea*, que possui entre seus componentes o trans-cariofileno.

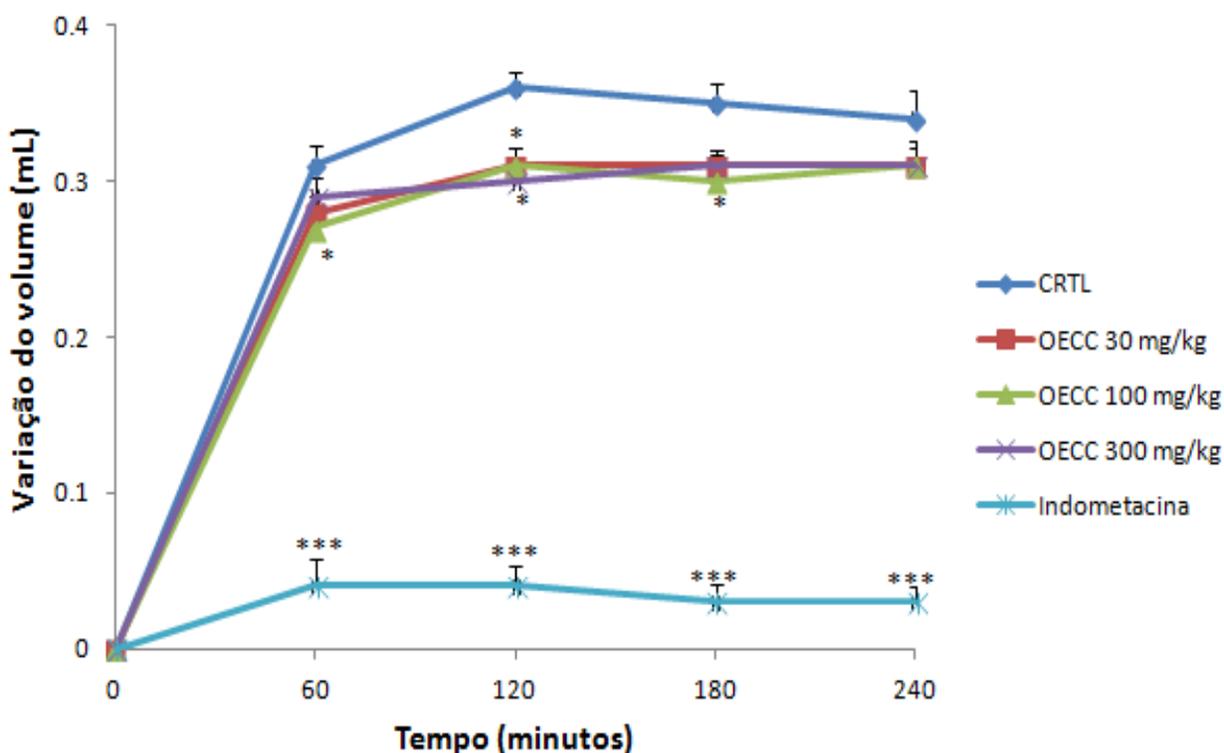


Figura 35- Efeito inibitório do tratamento prévio com OECC (v.o.) e indometacina (ip.) sobre a expressão do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em patas de camundongos. Os pontos representam as médias±epm de n=8, (*) p<0.05 e (***) p<0.001.

Para o caso do OECCn o efeito encontrado para o teste do edema, foi que não apresentou atividade antinociceptiva, e só apresentou diferença significativa o grupo controle positivo (Indometacina), ver Figura 36.

De outra forma a inibição significativa (p<0.05) das contorções abdominais pelo OECC em até 56 %, combinada ao fato do mesmo não promover aumento do tempo de permanência dos animais sobre a superfície aquecida no teste da placa quente, pode ser um indicativo de atividade antinociceptiva apenas de natureza periférica, sem expressão de atividade analgésica *via* SNC. Na mesma direção, os efeitos da administração prévia do OECC sobre a injúria e inflamação peritoneal aguda induzida pelo ácido acético, sugerem que a atividade inibitória do OECC sobre a dor parece estar associada à inibição do processo inflamatório.

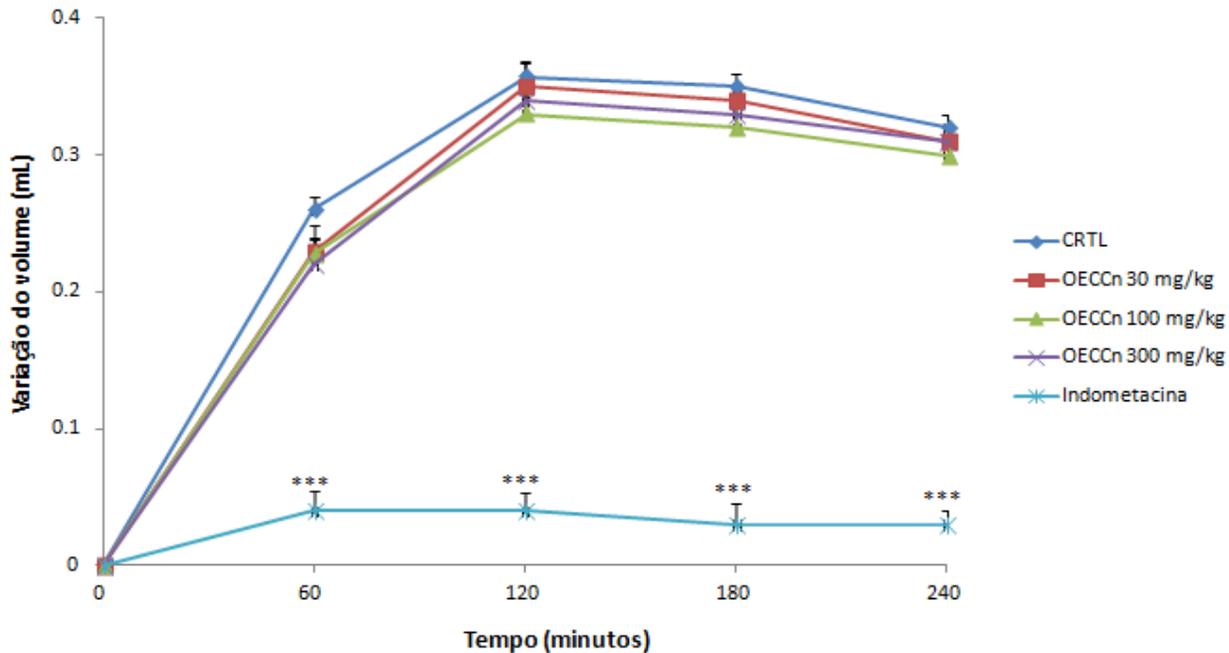


Figura 36. Efeito inibitório do tratamento prévio com OECCn (v.o.) e indometacina (ip.) sobre a expressão do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em patas de camundongos. Os pontos representam as médias±epm de n=8 e (***) p<0.001.

O linalol, que também no OECC, é componente majoritário, apresenta comprovada atividade antinociceptiva, conforme estudos de KHAN *et al.*, (2009). Entretanto, neste estudo, só é possível afirmar que, os efeitos apresentados pelo OECC representam o efeito somatório médio produzido pelo conjunto dos seus componentes.

Estudos farmacológicos adicionais com o OECC utilizando outros modelos para atingir, de modo mais consistente, os objetivos preconizados neste trabalho, parecem bastante indicados. Do mesmo modo, recomenda-se a continuidade de ensaios farmacológicos com os componentes isolados. Adicionalmente, sugere-se estudos para a elucidação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos.

Os resultados obtidos no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, resultantes da injúria e inflamação peritoneal aguda, mostram atividade inibitória do OECC sobre a dor associada ao processo inflamatório.

CONCLUSÕES

Evidenciou-se que a espécie *Croton Cajucara Benth* é uma fonte alternativa do linalol, a partir da extração do óleo essencial das folhas por hidrodestilação.

Os resultados encontrados a partir das caracterizações físico-química, dos componentes do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth*, apresentaram concordância nas propriedades analgésicas e anti-inflamatorias nos testes biológicos.

As nanoemulsões feitas a partir do óleo essencial da espécie *Croton Cajucara Benth* apresentaram estabilidade e tamanho media que permite funcionalizar com outras drogas visando novas alternativas no tratamento das atividades nociceptivas.

A administração oral do OECC, em camundongos, apresentou toxicidade interessantemente baixa e não induziu efeitos deletérios ao desempenho motor dos animais; expressou atividade antinociceptiva notadamente periférica; e teve discreto efeito antiinflamatório. O efeito analgésico parece ser por reflexo da influencia do OECC no processo inflamatório.

Os efeitos apresentados pelo OECC representam o efeito somatório médio produzido pelo conjunto dos seus componentes.

Estudos farmacológicos adicionais com o OECC utilizando outros modelos são importantes para dar maior sustentabilidade aos resultados bem como para elucidação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, SHABBAR; HAYAT, KHIZAR; KARANGWA, ERIC.; BASHARI, MOHANAD; ZHANG, XIAOMING. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139-157, 2013.

ABDON, A.P.V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; SANTOS, C.F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1215-1219, 2002.

ACOSTA, EDGAR J.;SZEKERES, ERIKA; HARWELL, JEFFREY H.; GRADY, BRIAN P.; SABATINI, DAVID A. Morphology of ionic microemulsions: comparison of SANS studies and the net-average curvature (NAC) model. **Soft Matter**, v. 5, n. 3, p. 551-561, 2009.

ADEBIYI, R.A.; ELSA, A.T.; AGAIE, B.M.; ETUK, E.U. Antinociceptive and antidepressant like effects of *Securidaca longepedunculata* root extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 234-239, 2006.

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. **Regulamento Técnico Para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Resolução nº 270**, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 23 de set. 2005.

AJAY, MANDAL; ACHINTA, BERA. Surfactant Stabilized Nanoemulsion: Characterization and Application in Enhanced Oil Recovery. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.67, p.07-25, 2012.

ALBERDAN, SILVA SANTOS; SÉRGIO, DE MELLO ALVES; FRANCISCO, JOSÉ CÂMARA FIGUEIRÊDO; OLINTO, GOMES DA ROCHA NETO. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Informe Técnico. Belém, PA. Novembro, 2004.

AMORIM, ANA CAROLINA L.; LIMA, CLEVERTON KLEITON F.; HOVELL, ANA MARIA C.; MIRANDA, ANA LUISA P.; REZENDE, CLAUDIA M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.

ANDREI, PATRÍCIA; DEL COMUNE, APARECIDA PERES. Aromatherapy and its applications. **Centro Universitário S. Camilo, São Paulo**, v. 11, n. 4, p. 57-68, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6ed. São Paulo: Premier 1999.

ARAÚJO V.C.; CORRÊA G.C.; MAIA J.G.S.; SILVA M.L.; GOTTLIEB O.R.; MARX M.C.; MAGALHÃES M.T. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazônica**, v. 1, p. 45- 47. 1971.

BALAKUMAR, KRISHNAMOORTHY; RAGHAVAN, CHELLAN VIJAYA; SELVAN, NATARAJAN TAMIL; PRASAD, RANGANATHAN HARI; ABDU, SIYAD. Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of Rosuvastatin calcium: Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 112, p. 337-343, 2013.

BARDAKCI, B.; SECILMIS, H.; YILMAZER, M. Infrared Spectral Composition of Rose Oil From Turkey. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 7303-7308, Dec 2009.

BAROCELLI, E.; CALCINA, F.; CHIAVARINI, M.; IMPICCIATORE, M.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; BALLABENI, V. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. **Life Sciences**, v. 76, n. 2, p. 213-223, 2004.

BELTRAME, J. M.; DA SILVA, V. L.; DOTTO, F.; Becker, K. M.; ALMIR, R. A. Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição. **Exp. Ciência e desenvolvimento sustentável**. Universidade Federal Tecnológica de Paraná. 2010.

BOMBARDA I, DUPUY N, DA JPLV, GAYDOU EM. Comparative chemometric analyses of geographic origins and compositions of lavandin var. Grosso essential oils by mid infrared spectroscopy and gaschromatography. **Analytics Chemic**, v. 613, n (1), p. 31–39. 2008.

BROCK, SARA COMELLI; TONUSSI, CARLOS ROGERIO. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: The involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, n. 3, p. 965-971, 2008.

BRUNETON, J. **Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales**. 2 ed. Editora Acribia. Zaragoza. 2001.

BUCKLE, J. Aromatherapy. **Nurse Times**, v.89, n. 20, p. 32-35. 1993.

BURGUERA, JOSÉ LUIS; BURGUERA, MARCELA; Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11– 20. 2012.

CANUTO, K.M. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do OE de Croton argyrophyloides Muell. Arg.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, 2005.

CARBONE, L. Pain Management Standards in the Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 322-328, 2012.

CARVALHO J.C.T.; SILVA M.F.C.; MACIEL M.A.M.; PINTO A.C.; NUNES D.S.; LIMA R.M.; BASTOS J.K.; SARTI S.J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities prototype of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-*nor*clerodane diterpene from *Croton Cajucara*. Part 1. **Planta Médica**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CAVALCANTE MELO, FRANCISCA HELVIRA; VASCONCELOS RIOS, EMILIANO RICARDO; MOURA ROCHA, NAYRTON FLAVIO; DE OLIVEIRA CITO, MARIA DO CARMO; FERNANDES, MARIANA LIMA; DE SOUSA, DAMIAO PERGENTINO; MENDES DE VASCONCELOS, SILVANIA MARIA; FLORENCO DE SOUSA, FRANCISCA CLEA. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1722-1729, 2012.

CELEDONIO, N. R. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* e seus constituintes: alfa-pineno e trans-cariofileno**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

CHAIYANA, WANTIDA; SAEIO, KIATTISAK; HENNINK, WIM E.; OKONOJI, SIRIPORN. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 32-40, 2010.

CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R.; ANGELO, P.C.S.; XAVIER, J.J.B.N.; SÁ SOBRINHO, A.F. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton Cajucara* Benth). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.117-119, 2006.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, p. S4 - S11, 2003.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the Pulp and Kernel Oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. C1156-C1161, 2011.

COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J.; PARRA, J.L.; COLL, J.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetics Sciences**, v. 11, p. 5-19, 1989.

CONCEIÇÃO, C.C.; MOTA, M.G.; NASCIMENTO, M.E.; VIEIRA, I.M. Flowers, fruits, seeds and plantules morphology of CCB *Croton Cajucara* Benth. (euphorbiaceae). PROCEEDINGS OF THE FIRST LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM ON THE PRODUCTION OF MEDICINAL, AROMATIC AND CONDIMENTS PLANTS. **Acta horticulturae**, p. 167-171, 2002.

CORRÊA, M.F., DE MELO, G.O., COSTA, SÔNIA S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18,p 785-797, 2008.

DA ROCHA, MARILENE L.; OLIVEIRA, LEANDRA E. G.; PATRICIO SANTOS, CAMILA C. M.; DE SOUSA, DAMIAO P.; DE ALMEIDA, REINALDO N.; ARAUJO, ARAUJO, DEMETRIUS A. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene alpha, beta-epoxy-carvone in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 743-749, 2013.

DA SILVA FROZZA, CAROLINE OLIVIERI; CELI GARCIA, CHARLENE SILVESTRIN; GAMBATO, GABRIELA; OLIVEIRA DE SOUZA, MARCIA DENIZE; SALVADOR, MIRIAN; MOURA, SIDNEI.; PADILHA, FRANCINE FERREIRA; SEIXAS, FABIANA KOEMMLING; COLLARES, TIAGO.; BORSUK, SIBELE; DELLAGOSTIN, ODIR ANTONIO; PEGAS HENRIQUES, JOAO ANTONIO; ROESCH-ELY, MARIANA. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

DE COMPOS, V. E. B.; RICCI, E.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsions as Delivery Systems for Lipophilic Drugs. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2881-2890, 2012.

DE OLIVEIRA, ANDERSON MARQUES; CONSERVA, LUCIA M.; DE SOUZA FERRO, JAMYLLÉ N.; BRITO, FABIOLA DE ALMEIDA; LYRA LEMOS, ROSANGELA P.; BARRETO, EMILIANO. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Octacosanol from the Leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1598-1611, 2012.

DELMAS, THOMAS.; PIRAUX, HELENE; COUFFIN, ANNE-CLAUDE; TEXIER, ISABELLE; VINET, FRANCOISE; POULIN, PHILIPPE; CATES, MICHAEL E.; BIBETTE, JEROME. How to Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. **Langmuir**, v. 27, n. 5, p. 1683-1692, 2011.

DORDEVIC, SANELA M.; CEKIC, NEBOJSA D.; ISAILOVIC, TANJA M.; MILIC, JELA R.; VULETA, GORDANA M.; LAZIC, MIODRAG L.; SAVIC, SNEZANA D. Nanoemulsions produced by varying the type of emulsifier and oil content: effect of formulation and process parameters on the characteristics and physical stability. **Hemijska Industrija**, v. 67, n. 5, p. 795-809, 2013.

EIDI, A.; EIDI, M.; MOZAFFARIAN, V.; RUSTAIYAN, A.; MAZOOJI, A.; KHABOORI, Z.; NABIUNI, F. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Ethanolic Extract of *Salvia syriaca* L. in Mice. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 394-399, 2011.

EL-DIN, M. R. NOOR; EL-HAMOULY, SABRNAL H.; MOHAMED, H. M.; MISHRIF, MARWA R.; RAGAB, AHMAD M. Formation and Stability of Water-in-Diesel Fuel Nanoemulsions Prepared by High-Energy Method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 575-581, 2013.

ELHABAZI, K.; OUACHERIF, A.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; ABBAD, A.; BENHARREF, A.; ZYAD, A.; CHAIT, A.; DALAL, A. Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 10, p. 262-267, 2008.

FALCÃO, H. S.; MARIATH, I. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants of the American continent with antiulcer activity. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1-2, p. 132-146, 2008.

FAO. Food and fruit-bearing Forest species. Examples from Latin America. Roma: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, (FAO Forestry Paper 44/3), 1986.

Farmacopedia 4^a Ed. Parte I. v.3, p 3-8, 1988.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. v. 98, p. 729–733, 2003.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228-236, 2007.

GARCIA, ELIANA DE FARIA; DE OLIVEIRA, MARIANA ASSIRIA; GODIN, ADRIANA MARTINS; FERREIRA, WALLACE CARVALHO; SILVA BASTOS, LEANDRO FRANCISCO; COELHO, MARCIO DE MATOS; BRAGA, FERNAO CASTRO. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

GEOFFREY, A. CORDELL; MARY LOU QUINN-BEATTIE; NORMAN R. FARNSWORTH. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytotherapy Research**. 15, p.183–205, 2001.

GOYAL, ROHIT; SHARMA, PYARE LAL; SINGH, MANJEET. Possible attenuation of nitric oxide expression in anti-inflammatory effect of *Ziziphus jujuba* in rat. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3-4, p. 514-518, 2011.

GUAN WENQIANG.; LI, SHUFEN.; YAN, RUIXIANG.; TANG, SK.; QUAN, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1558-1564, 2007.

HOOKER, E. P. Final Report on the Safety Assessment of Trichloroethane. **International Journal of Toxicology**, v. 27, p. 107-138, 2008.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**, v. 69, p. 2911– 2919, 2001.

JAVADI, MARJAN; PITT, WILLIAM G.; BELNAP, DAVID M.; TSOSIE, NAAKAI H.; HARTLEY, JONATHAN M. Encapsulating Nanoemulsions Inside Liposomes for Ultrasonic Drug Delivery. **Langmuir**, v. 28, n. 41, p. 14720-14729, 2012.

JIN, KYONG-SUK; JUN, MIRA; PARK, MIN-JI; OK, SEON; JEONG, JAE-HAN; KANG, HYE-SOOK; JO, WAN-KEUN; LIM, HO-JIN; JEONG, WOO-SIK. Promises and risks of unsaturated volatile organic compounds: Limonene, pinene, and isoprene. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 447-456, 2008.

KARADAG, AYSE; YANG, XIAOQING; OZCELIK, BERAAT; HUANG, QINGRONG. Optimization of Preparation Conditions for Quercetin Nanoemulsions Using Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 2130-2139, 2013.

KHAN, MAHMUD T. H.; ATHER, ARJUMAND; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, MARIA APARECIDA M. Potential benefits of the 19-nor-clerodane trans-dehydrocrotonin on the central nervous system. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 7-13, 2009.

KHARISSOVA, OXANA V.; KHARISOV, BORIS I.; RUIZ VALDES, JUAN JACOBO.; ORTIZ MENDEZ, UBALDO. Ultrasound in Nanochemistry: Recent Advances. **Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 429-448, 2011.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L.S.E.; MANSUR C.R. E. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, n(2), p. 295-300, 2010.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, L.; NORTON, I. T. Comparing droplet breakup for a high-pressure valve homogeniser and a Microfluidizer for the potential production of food-grade nanoemulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 158-163, 2013.

MACIEL, M. A.; DANTAS, T. N.; CÂMARA, J. K.; PINTO, A.C.; VEIGA JR.; V. F.; KAISER, C. R.; PEREIRA, N. A.; CARNEIRO, C. M.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; AGNER, A. R.; CÓLUS, I. M.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; GRYNBERG, N. F.; ESTEVES-SOUZA, A.; PISSINATE, K.; ECHEVARRIA, A. Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of Croton Cajucara. **Advances in Phytomedicine**, v. 2, p. 225-253, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO A. C.; VEIGA V.F.; GRYNBERG N.F.; ECHEVARRIA A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3), p. 429-38, 2002.

MAO, LIKE.; YANG, JIA.; XU, DUOXIA.; YUAN, FANG.; GAO, YANXIANG. Effects of Homogenization Models and Emulsifiers on the Physicochemical Properties of β -Carotene Nanoemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 7, p. 986-993, 2010.

MARQUES-CANUTO, K. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* Muell.** Arg. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

MARTINEZ, ALEJANDRO M. ACEITES ESENCIALES. Informe técnico. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Febrero 2003.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

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

MENDOÇA, M. S.; ILKIU-BORGES, F.; SOUZA, M. C. Anatomia foliar de *Croton Cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 10, p.18-25, 2008.

MISHRA, DEVENDRA; BISHT, GANGA; MAZUMDAR, PAPIYA MITRA; SAH, SANGEETA PILKHWAL. Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 11, p. 1297-1301, 2010.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOTA, MAGALY L.; LOBO, COELHO LOBO, LIS TAVARES.; DA COSTA, DA COSTA, JOSE GALBERTO M.; COSTA, LEANDRO S.; ROCHA, HUGO A. O.; ROCHA E SILVA, LUIZ F.; POHLIT, ADRIAN M.; DE ANDRADE NETO, VALTER F. In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity of Essential Oils and Chemical Components from Three Medicinal Plants Found in Northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, n. 7, p. 658-664, 2012.

MOTTA, LUCIMAR B.; FURLAN, CLAUDIA M.; SANTOS, DEBORAH Y. A. C.; SALATINO, MARIA L. F.; DUARTE-ALMEIDA, JOAQUIM M.; NEGRI, GIUSEPPINA; DE CARVALHO, JOAO E.; RUIZ, ANA LUCIA T. G.; CORDEIRO, INES; SALATINO, ANTONIO. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 6, p. 972-977, 2011.

MÜLLER, A. H., Oster, C. B., Luna, M. S. Terpenóides de *C. Cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **38a Reunião Anual da SBPC**. São Paulo, SP, Brazil, p. 631, 1986.

NARDI, GEISSON MARCOS; DALBO, SILVIA; DELLE MONACHE, FRANCO; PIZZOLATTI, MOACIR GERALDO); RIBEIRO-DO-VALLE, ROSA MARIA. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 73-78, 2006.

NEVES, T. F. S. N. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do eugenol**. 2007. Dissertação (Mestrado acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

OLIVEIRA, DANILO R.; LEITÃO, GILDA G.; COELHO, TATIANE S.; DA SILVA, PEDRO E. ALMEIDA.; LOURENÇO, MARIA CRISTINA S.; ARQMO.; LEITÃO, SUZANA G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011.

PEIXOTO, ROSANA N. S.; GUILHON, GISELLE M. S. P.; ZOGHBI, MARIA DAS GRAÇAS B.; ARAÚJO, ISABELLA S.; UETANABARO, ANA PAULA T.; SANTOS, LOURIVALDO S.; DAVI DO S. B. Brasil. Volatiles, A Glutarimide Alkaloid and Antimicrobial Effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3195-3205, 2013.

PEREIRA, ALINE Q.; CHAVES, FRANCISCO C. M.; PINTO, SHAFT C.; LEITAO, SUZANA G.; BIZZO, HUMBERTO R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton Cajucara* Benth. **Journal of essential oil research**, v. 23, p. 20-23, 2011.

PERIANAYAGAM, J.B.; SHARMA, S.K.; PILLAI, K.K. Ethnopharmacological communication Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p. 410.414, 2006.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at Constant temperature using a factorial design study. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspect*, v.288, p.144-150, 2006.

PORT'S, POLLYANE DA SILVA; CHISTE, RENAN CAMPOS; GODOY, HELENA TEIXEIRA; PRADO, MARCELO ALEXANDRE. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.

PRIETO, CRISTINA; CALVO, LOURDES. Performance of the Biocompatible Surfactant Tween 80, for the Formation of Microemulsions Suitable for New Pharmaceutical Processing. *Journal of Applied Chemistry*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

PURVES, et al. *Neuro ciências*. Cap. 10. 2ed, p. 231- 250. 2010.

RAINA, A. P.; KUMAR, A.; PAREEK, S. K.; MISHRA, S. K.; SHARMA, S. K.; NEGI, K. S. Phyto-Chemical Characterization of Important Medicinal Herbs of India. *II International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants*, v. 972, p. 97-104, 2013.

RISSATO, SANDRA REGINA; ALMEIDA, MARCOS VINICIUS; DA SILVA, LETÍCIA CAETANO. Estudo do OE de *Eugenia uniflora* como subsidio para aplicação como fitofármaco. *Salusvita, Bauru*, v.23, n. 2, p. 209-222, 2004.

RISTIC, MIHAILO S.; DORDEVIC, SOFIJA M.; DOKOVIC, DEJAN D.; TASIC, SLAVOJUB R. Setting a standard for the essential oil of chamomile originating from Banat. In: SALAMON, I. (Ed.). *Proceedings of the First International Symposium on Chamomile Research, Development and Production*. Leuven 1: *International Society Horticultural Science*, 2007.

RODRIGUES, GRAZIELA RAMOS; DI NASO, FÁBIO CANGERI; PORAWSKI, MARILENE; MARCOLIN, EDER; KRETZMANN, NÉLSON ALEXANDRE; FALCÃO FERRAZ, ALEXANDRE DE BARROS; RICHTER, MARC FRANCOIS; MARRONI,

CLÁUDIO AUGUSTO; MARRONI, NORMA POSSA. Treatment with Aqueous Extract from *Croton Cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

RODRIGUES, IGOR A.; AZEVEDO, MARIANA M. B.; CHAVES, FRANCISCO C. M.; BIZZO, HUMBERTO R.; CORTE-REAL, SUZANA.; ALVIANO, DANIELA S.; ALVIANO, CELUTA S.; ROSA, MARIA S. S.; VERMELHO, ALANE B. In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton Cajucara* (red CCB) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.

RUBIO, LAURA.; MOTILVA, MARIA-JOSE.; ROMERO, MARIA-PAZ. Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 943-953, 2013.

SÁ SOBRINHO A.; KOKETSU M.; LOPES D.; DE OLIVEIRA, R.; LIMP, S. Linalol, principal componente químico dos óleos essenciais da folha da CCB (*Croton cajuçara* Benth) e da madeira do pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans). **Informe Técnico da Embrapa Manaus**. N° 15, p. 1-4, 1998.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian chemical, society**, v. 18(1), p. 11-33, 2007.

SALVIA-TRUJILLO, LAURA; ALEJANDRA ROJAS-GRAUE, M.; SOLIVA-FORTUNY, ROBERT; MARTIN-BELLOSO, OLGA. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 401-407, 2013.

SANDASI, M., KAMATOU, G.P.P., GAVAGHAN, C., BARANSKA, M. AND VILJOEN, A.M. A quality control method for geranium oil based on vibrational spectroscopy and chemometric data analysis. **Vibration Spectroscopy**, v. 57, p. 242-247, 2011.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, F.A.; JEFERSON, F.A.; SANTOS, C.C.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.

SANTOS, O. V.; CORREA, N. C. F.; CARVALHO, R. N., JR.; COSTA, C. E. F.; FRANCA, L. F. F.; LANNES, S. C. S. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 841-847, 2013.

SETZER, WILLIAM N. Chemical compositions of the bark essential oils of *Croton monteverdensis* and *Croton niveus* from Monteverde, Costa Rica. **Natural product communications**, v. 1, p. 567-572, 2006.

SHAABAN, H. A. E.; EL-GHORAB, A. H.; SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 2, p. 203-212, 2012.

SILVA, ACARILIA EDUARDO; BARRATT, G.; CHERON, M.; EGITO, E.S.T. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 641-648, 2013.

SILVA, HELDER D.; CERQUEIRA, MIGUEL A.; SOUZA, BARTOLOMEU W. S.; RIBEIRO, CLARA; AVIDES, MARIA C.; QUINTAS, MAFALDA A. C.; COIMBRA, JANE S. R.; CARNEIRO-DA-CUNHA, MARIA G.; VICENTE, ANTONIO A. Nanoemulsions of beta-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 130-135, 2011.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; RAO, V.S.; Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton Cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. **Planta Médica**, v.67 (8), p.763-5, 2001b.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton Cajucara* Benth, in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 452-456, 2001a.

SIMIONATTO, EUCLESIO; CHAGAS, MARINA O.; PERES, MARIZE T. L. P.; HESS, SONIA C.; DA SILVA, CRISTIANE B.; RE-POPPI, NILVA; GEBARA, SAMIA S.; CORSINO, JOAQUIM; MOREL, ADEMIR FARIAS; STUKER, CAROLINE Z. Chemical Composition and Biological Activities of Leaves Essential Oil From *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 5, p. 590-599, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª edição. Editora da UFSC, p.467, 2003.

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

SOUSA, P. J. C. **Estudos Farmacológicos do OE de *Mentha x vilosa* e seu Principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrointestinal de Cobaia e pressão arterial de rato**. Teses de Doutorado, Universidade Federal do Ceará. 1999.

TAHERIAN, A.A.; VAFAEI, A.A.; AMERI, J. Opiate System Mediate the Antinociceptive Effects of *Coriandrum sativum* in Mice. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 679-688, 2012.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C. A.; Cuman, R. K. N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Rosmarinus officinalis L. Essential Oil in Experimental Animal Models. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 741-746, 2008.

TANG, SIAH YING; SIVAKUMAR, MANICKAM; NG, ANGELA MIN-HWEI; SHRIDHARAN, PARTHASARATHY. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 299-306, 2012.

TAWAHA, K. A.; HUDAIB, M. M. Chemical Composition of the Essential Oil from Flowers, Flower Buds and Leaves of Thymus capitatus Hoffmanns & Link from Jordan. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 6, p. 988-996, 2012.

TREGUIER, J.P.; LO.P., SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions et diagrammes eausurfactil-huile Etude d'un système eau. Brijs 92 et 96- huile de vaseline influence de hydrophile du surfactil. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 50, p. 421-431, 1975.

TSAO, R.; ZHOU, T. Natural Antimicrobials from Plant Essential Oils. In: ZHU, P. C. (Ed.). **New Biocides Development: Combined Approach of Chemistry and Microbiology**. Washington: American Chemical Society, v.967, p.364-387, 2007.

TURIEL, NATHALIE A.; RIBEIRO, ALCY F.; CARVALHO, ELISANGELA ELENA N.; DOMINGOS, VANESSA D.; LUCAS, FLAVIA CRISTINA A.; CARREIRA, LEA MARIA M.; ANDRADE, ELOISA HELENA A.; MAIA, JOSE GUILHERME S. Essential Oils Composition of Croton Species from the Amazon. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1471-1472, 2013.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia** — Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático, 2nd ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, CNPq-MCT (Coleção Adolpho Ducke), Belém, Brazil, p. 124–125, 1993.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004.

VENANCIO, ANTONIO MEDEIROS; CASIMIRO ONOFRE, ALEXANDRE SHERLLEY; LIRA, AMINTAS FIGUEIREDO; ALVES, PERICLES BARRETO; BLANK, ARIE FITZGERALD; ANTONIOLLI, ANGELO ROBERTO; MARCHIORO, MURILO; ESTEVAM, CHARLES DOS SANTOS; DE ARAUJO, BRANCILENE SANTOS. Chemical Composition, Acute Toxicity, and Antinociceptive Activity of the Essential Oil of a Plant Breeding Cultivar of Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Planta Medica**, v. 77, n. 8, p. 825-829, 2011.

VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Genetic resources of aromatic plants from Brazil. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 58, n. 3-4, p. 263-271, 2010.

WATSON LOH. **Manual de laboratório Físico-química de solução de polímeros e surfactantes**. Unicamp, 2011.

WOLFFENBÜTTEL, ADRIANA NUNES. Óleos essenciais. **Boletim Informativo CRQ-V**, ano XI, n.º105, p. 6-7, novembro-dezembro, 2007.

XU, DIAN-HONG.; HUANG, YA-SI.; JIANG, DONG-QING.; YUAN, KE. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three Hyptis species. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 9, p. 1125-1130, 2013.

YU, CHENG-HAO; TANG, WEI-ZHONG; PENG, CHENG; SUN, TAO; LIU, BIN; LI, MIN; XIE, XIAO-FANG; ZHANG, HONG. Diuretic, anti-inflammatory, and analgesic activities of the ethanol extract from *Cynoglossum lanceolatum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 149-154, 2012.

ZANATTA, C. F. **Aplicação do óleo de buriti no desenvolvimento de emulsões e estudo da citotoxicidade e potencial fotoprotetor em cultivo celular**. Tese (Doutorado), Ribeirão Preto – USP, 2008.

ZHANG, KAILIANG; SONG, ZHITANG; LIN, CHENGLU; FENG, SONGFIN; CHEN, BOMY. Colloidal nano-abrasives and slurry for chemical-mechanical polishing of semiconductor materials. **Journal of Ceramic Processing Research**, v. 8, n. 1, p. 52-55, 2007.

ZHOU, DAN; YU, WEN; XU, QIN; YIN, JIAN-ZHONG. Solubilization of Polyalcohol in Supercritical CO₂ Microemulsion. **Acta Physico-Chimica Sinica**, v. 27, n. 6, p. 1300-1304, 2011.