

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

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lantana camara* Linn: CARACTERIZAÇÃO,  
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO E ATIVIDADE ANTI-  
LEISHMANIA**

**ANTONIO OLIVEIRA DA COSTA**

**RIO BRANCO  
2015**



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



**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lantana camara* Linn: CARACTERIZAÇÃO,  
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO E ATIVIDADE ANTI-  
LEISHMANIA**

**ANTONIO OLIVEIRA DA COSTA**

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 em Ciências**.

Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica

Orientador \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria

Coorientador \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Rio Branco – Acre  
Agosto de 2015

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

**Folha de Aprovação**

Antonio Oliveira da Costa

ÓLEO ESSENCIAL DE *Lantana camara* Linn: CARACTERIZAÇÃO,  
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO E ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA

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 em Ciências**.

Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Fernando S. Escócio D. Viana de Faria (Orientador)  
Universidade Federal do Acre – UFAC

---

Profa. Dra. Shirani Kaori Haraguchi  
Universidade Federal do Acre – UFAC

---

Prof. Dr. Humberto Hissashi Takeda  
Universidade Federal de Rondônia – UNIR (Avaliador Externo)

Dedico este trabalho a Deus por ter me dado força para concluir os meus objetivos, a minha mãe Maria Araújo de Oliveira, minha esposa Maria da Conceição da Silva Alves Oliveira e a meus irmãos, todos esses tem me dado imenso apoio em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

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

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 Departamento da Polícia Federal no uso do Laboratório e a Perita Nathalia Mai De Rose por suas contribuições.

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

Ao Professor Dr. Jorge Luiz Brito de Faria da UFMT pela realização das medidas Raman.

Ao Dr. Roberto Nicolete e sua equipe do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – Fiocruz Rondônia pela caracterização das nanoemulsões, os testes de citotoxicidade e atividade anti-leishmania.

Ao Dr. Igor Anatolievich Degterev pelas orientações e correções que foram de grande ajuda para este trabalho.

Ao Professor Mestre José Carlos da Silva Oliveira (Ponciano) por seus ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha pelas suas contribuições e sugestões.

Aos professores do PPG-CITA que tive nas diferentes disciplinas; todos eles contribuíram enormemente nesta pesquisa.

O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.

**Issac Newton**

## RESUMO

*Lantana camara* Linn é uma planta do gênero *Lantana* (*Verbenaceae*) vulgarmente conhecida no Brasil como camará ou cambará-de-chumbo, sendo a espécie mais comum do gênero. *Lantana camara* Linn é utilizada popularmente para uso medicinal sendo reportada para vários tipos de tratamentos como tumores, febre, gripe, feridas, catapora, reumatismos, asma, pressão alta, bronquite, úlceras entre outras; assim como também seu óleo essencial tem sido aplicado para atividades antifúngica e antibacteriana. A presente pesquisa tem como objetivo extrair óleo essencial das folhas da espécie *Lantana camara* Linn e calcular o seu rendimento, realizar a caracterização físico-química, desenvolver nanoemulsões do tipo óleo em água e avaliar a ação anti-leishmania do óleo essencial e de das nanoemulsões formuladas. As folhas da espécie foram coletadas no município de Rio Branco e submetidas à hidrodestilação para a obtenção do óleo essencial (OE). Depois de obtido, o óleo foi submetido às análises de índice de acidez, índice de refração, densidade, Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), espectroscopias Raman e Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN). Foram desenvolvidas e preparadas nanoemulsões pelo método de emulsificação ultrassônica com formulações contendo tensoativos Span 80 e Tween 80 com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) variando de 8,0 a 15, onde foram testadas a fim de empregar aquela que permitisse a formação de nanoemulsões. O óleo essencial e as nanoemulsões formuladas foram avaliados quanto à ação anti-leishmania *in vitro*. Como resultado deste trabalho obteve-se para o rendimento do óleo obtido a partir de folhas secas um valor de 0,25 (v/m). Na composição química, usando o método de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) foram identificados um total de setenta e seis compostos, sendo os majoritários o  $\beta$ -trans-Farneseno (29,07%), Germacreno D (24,84%),  $\beta$ -Cariofileno (10,89%), Elixeno (4,81%) e o  $\alpha$ -Cariofilenol (4,39%). Foram preparadas 25 formulações de nanoemulsão. A formação de nanoemulsões se deu no valor de EHL entre 9,0 a 15,0, com tamanhos variando entre 18,56 nm a 93,24 nm e o potencial zeta entre - 6,08 mV a - 23,50 mV. O óleo essencial puro bem como as nanoemulsões apresentou alta inibição contra a *Leishmania amazonensis* na forma promastigota. Nanoemulsões formuladas apresentaram alta inibição do crescimento da *Leishmania amazonensis* na forma promastigota e baixa citotoxicidade para os macrófagos de camundongos J774 usados como modelo de toxicidade sobre os tecidos de hospedeiro. Os resultados obtidos indicam a viabilidade de estudos posteriores mais aprofundados contra esse patógeno.

**Palavras chaves:** Emulsificação ultrassônica, *Lantana camara* Linn, nanoemulsão, óleo essencial.

## ABSTRACT

*Lantana camara* Linn is the most common plant of the genus *Lantana* (Verbenaceae) commonly known in Brazil as “camara”, “cambará-de-chumbo” that is popularly used for medicinal purposes as reported for various types of treatments such conditions as tumors, fever, flu, stomach pain, sores, chicken pox, measles, rheumatism, asthma, high blood pressure, bronchitis, ulcers among others. The EO from this plant possess antifungal and antibacterial activity. This research aimed to extract the EO from the leaves of the species *Lantana camara* Linn, to calculate income, to perform the physicochemical characterization, to develop oil-water nanoemulsions and to evaluate anti-leishmania action of both the EO and nanoemulsions. The leaves of this species were collected in Rio Branco and submitted to hydrodistillation to obtain the EO. The EO, thus obtained, was subjected to the measurements of the density, acidity and refractive indexes. Studies of the GC-MS, NMR and Raman spectroscopies of the EO were performed. The oil-water nanoemulsions based on the EO were obtained using ultrasonic emulsification method with the pair of Span 80 and Tween 80 surfactants with hydrophilic - lipophilic balance (HLB) ranging from 8.0 to 15. These nanoemulsions were evaluated for size of particles, z-potential, polydispersity, and anti-leishmania action *in vitro*. We obtained the yield of oil from dried leaves 0.25 ml/100 g. The EO was separated and chemical composition was identified. A total of seventy six compounds were detected, the majority being the trans- $\beta$ -farnesene (29.07%), Germacrene D (24.84%),  $\beta$ -caryophyllene (10.89%), Elixeno (4.81%) and the  $\alpha$ -caryophyllenol (4.39%). Twenty five formulations were prepared, the formation of nanoemulsions was given in HLB between 9.0 to 15.0, with sizes ranging from 18.56 nm to 93.24 nm and zeta potential of - 6.08 mV to - 23, 50 mV. Both the EO and nanoemulsions showed high inhibition of growth the *Leishmania amazonensis* promastigote. At the same time, nanoemulsions showed low cytotoxicity against murine macrophages ( $\leq 10\%$  growth inhibition) while the EO was more toxic (50%).

**Key words:** ultrasound emulsification, *Lantana camara* Linn, nanoemulsion, essential oil.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Brasil em 2005 .....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular dos fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose .....	18
<b>Figura 3.</b> Método tradicional de descoberta de drogas a partir de produtos naturais .....	21
<b>Figura 4.</b> Método moderno de descoberta de drogas a partir de produtos naturais .....	22
<b>Figura 5.</b> Formação de terpenos a partir de unidades de isoprenos .....	24
<b>Figura 6.</b> Terpenos e terpenóides .....	25
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular de alguns alcaloides .....	26
<b>Figura 8.</b> <i>Lantana camara</i> Linn .....	27
<b>Figura 9.</b> Extrator de Clevenger Modificado .....	30
<b>Figura 10.</b> Processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão .....	36
<b>Figura 11.</b> Molécula anfifílica .....	42
<b>Figura 12.</b> Área de coleta das folhas de <i>Lantana camara</i> Linn .....	49
<b>Figura 13.</b> Cromatógrafo a gás em interface com um detector seletivo de massa .....	53
<b>Figura 14.</b> Representação do Diagrama Ternário .....	58
<b>Figura 15.</b> Diagrama ternário: OELCL, tensoativo e água .....	58
<b>Figura 16.</b> Estrutura molecular dos principais constituintes do OELCL .....	66
<b>Figura 17.</b> Cromatograma do OELCL .....	70
<b>Figura 18.</b> Espectro de massa do $\beta$ -trans-farneseno .....	70
<b>Figura 19.</b> Espectro de massa do Germacreno D .....	71
<b>Figura 20.</b> Espectro de massa do $\beta$ -cariofileno .....	71
<b>Figura 21.</b> Espectro de massa do Elixeno .....	71
<b>Figura 22.</b> Espectro de massa do $\alpha$ -cariofilenol .....	72
<b>Figura 23.</b> Espectro de massa do trans-nerolidol .....	72
<b>Figura 24.</b> Espectro de massa do $\alpha$ -humuleno .....	72
<b>Figura 25.</b> Espectro de massa do $\delta$ -guaieno .....	73
<b>Figura 26.</b> Espectro de massa do longifoleno .....	73
<b>Figura 27.</b> Espectro de massa do $\delta$ -cadineno .....	73

<b>Figura 28.</b> Espectro de massa do cypereno .....	74
<b>Figura 29.</b> Espectro de massa do $\alpha$ -guaieno .....	74
<b>Figura 30.</b> Espectro Raman do OELCL no intervalo de 80 a 3600 $\text{cm}^{-1}$ .....	75
<b>Figura 31.</b> Expansão do espectro Raman do OELCL compreendido entre 175 $\text{cm}^{-1}$ a 1600 $\text{cm}^{-1}$ .....	76
<b>Figura 32.</b> Expansão do espectro Raman do OELCL compreendido entre 1500 $\text{cm}^{-1}$ a 3600 $\text{cm}^{-1}$ .....	77
<b>Figura 33.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ do OELCL .....	78
<b>Figura 34.</b> Expansão do espectro RMN de $^1\text{H}$ do OELCL com deslocamento químico entre 0,0 ppm e 3,0 ppm .....	78
<b>Figura 35.</b> Expansão do espectro RMN de $^1\text{H}$ do OELCL com deslocamento químico entre 3,5 ppm e 7,5 ppm .....	79
<b>Figura 36.</b> Emulsões formuladas com 10% de tensoativos e EHL variando de 8,0 a 15,0 .....	81
<b>Figura 37.</b> Emulsões formuladas com 5% de tensoativos e EHL variando de 8,0 a 15,0 .....	81
<b>Figura 38.</b> Emulsões formuladas de acordo com o diagrama ternário .....	82
<b>Figura 39.</b> Efeito do OELCL e nanoemulsões sobre formas promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	83
<b>Figura 40.</b> Citotoxicidade do OELCL e nanoemulsões em macrófagos murino J774 .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Esqueletos estruturais de compostos fenólicos e polifenólicos (o grupo hidroxila não é mostrado) .....	24
<b>Tabela 2:</b> Atividades Biológicas do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn .....	28
<b>Tabela 3:</b> Classificação dos coloides de acordo com as fases dispersa e de dispersão ...	33
<b>Tabela 4:</b> Classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL .....	44
<b>Tabela 5:</b> Características dos tensoativos utilizados nas formulações .....	54
<b>Tabela 6:</b> Massas dos tensoativos para formulações de diferentes EHL .....	56
<b>Tabela 7:</b> Composição das formulações para estudo do EHL – 5% de tensoativos .....	56
<b>Tabela 8:</b> Composição das formulações para estudo do EHL – 10% de tensoativos .....	56
<b>Tabela 9:</b> Quantidade de água, tensoativos e óleo das formulações contidas no diagrama ternário .....	59

<b>Tabela 10:</b> Rendimento do OELCL .....	62
<b>Tabela 11:</b> Rendimento do OELCL reportado na literatura .....	63
<b>Tabela 12:</b> Densidade do OELCL .....	64
<b>Tabela 13:</b> Medida do índice de acidez do OELCL .....	65
<b>Tabela 14:</b> Medida do pH do OELCL .....	65
<b>Tabela 15:</b> Compostos do OELCL .....	67
<b>Tabela 16:</b> Posição e identificações das bandas observadas nos espectros Raman do OELCL .....	76
<b>Tabela 17:</b> Valores do potencial zeta, do tamanho e do índice de polidispersividade das formulações .....	80
<b>Tabela 18:</b> Análise de variância entre os grupos testados para atividade anti-leishmania .....	83
<b>Tabela 19:</b> Teste de Tukey realizado para os tratamentos anti-leishmania .....	83
<b>Tabela 20:</b> Análise de variância entre os grupos testados para citotoxicidade frente aos macrófagos .....	85
<b>Tabela 21:</b> Teste de Tukey realizado para os tratamentos de citotoxicidade frente aos macrófagos .....	85

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Energia livre de Gibbs $\Delta G$ associada a formação de nanoemulsões .....	38
<b>Equação 2:</b> Teor de óleo ou rendimento de extração (%) .....	50
<b>Equação 3:</b> Índice de acidez .....	52
<b>Equação 4:</b> Equação de Griffin para o cálculo do $EHL_{final}$ do Tensoativo .....	55
<b>Equação 5:</b> Equação da Massa Total do Tensoativo .....	55
<b>Equação 6:</b> Cálculo da Citotoxicidade em Porcentagem .....	61

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**A/O** = Água em óleo

**BioNCEs** = Entidades químicas biotivas

**CG-EM** = Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

**CL-DAF** = Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Fotodiodo

**CL-EM** = Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa

**CL-RMN** = Cromatografia Líquida acoplada à Ressonância Magnética Nuclear

**DMS** = Diferença Mínima Significativa

**DMSO** = Dimetilsulfóxido

**EHL** = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

**EM** = Espectrometria de Massa

**HPLC** = Cromatografia líquida de alta eficiência

**HTS** = Triagem de alto rendimento

**IV** = Infravermelho

**KOH** = Hidróxido de Potássio

**LCL** = *Lantana camara* Linn

**LTA** = Leishmaniose Tegumentar Americana

**MTT** = Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio

**NADH** = Dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NADPH** = Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NaOH** = Hidróxido de Sódio

**O/A** = Óleo em água

**OE** = Óleo Essencial

**OELCL** = Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

**OEs** = Óleos Essenciais

**OMS** = Organização Mundial de Saúde

**pH** = Potencial Hidrogeniônico

**PIT** = Temperatura de Inversão de Fase

**RMN** = Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI** = Meio de cultura desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute

**TO** = Teor de Óleo

**UV** = Ultravioleta

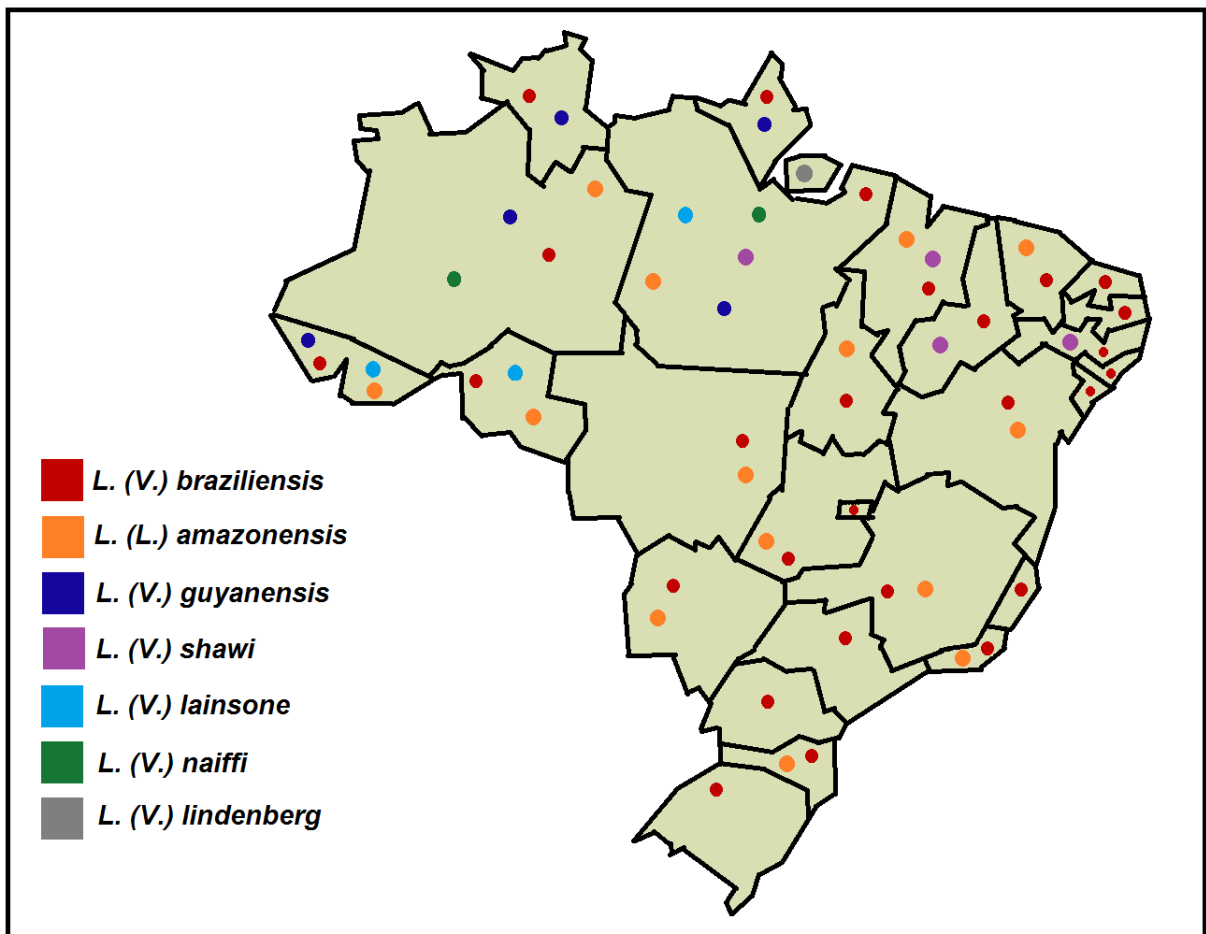
## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 As Leishmanioses.....	17
2.2 História dos produtos naturais.....	18
2.2.1 Produtos Naturais.....	18
2.2.2 Produtos naturais no uso medicinal.....	19
2.2.3 O desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais.....	20
2.2.4 Metabolismo secundário.....	23
2.3 <i>Lantana camara</i> Linn.....	26
2.4 Óleo essencial.....	29
2.5 Colóides.....	32
2.5.1 Emulsões.....	33
2.5.1.1 Nanoemulsões.....	34
2.5.1.1.1 Formação de nanoemulsão.....	36
2.5.1.1.2 Estabilidade das nanoemulsões.....	37
2.5.1.1.3 Potencial zeta.....	39
2.5.1.1.4 Fatores de estabilidade das nanoemulsões.....	40
2.5.1.1.5 Agentes emulsificantes.....	41
2.5.1.1.6 Equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL).....	43
2.6 Nanociência e Nanotecnologia e Nanobiotecnologia.....	44
3 MATÉRIAS E MÉTODOS.....	47
3.1 Instrumentação.....	47
3.2 Reagentes e soluções.....	48
3.3 Metodologia.....	48
3.3.1 Coletas das folhas.....	48
3.3.2 Seleção do material botânico.....	49
3.3.3 Cálculo do rendimento (%) do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	49
3.3.4 Extração do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	50
3.3.5 Caracterização físico-química do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	51
3.3.5.1 Índice de Refração.....	51
3.3.5.2 Medida da Densidade.....	51

3.3.5.3 Medida do Índice de Acidez.....	51
3.3.5.4 Medida do pH.....	52
3.3.5.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	52
3.3.5.6 Análises espectroscópicas do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	53
3.3.5.6.1 Espectroscopia Raman.....	53
3.3.5.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	54
3.3.6 Desenvolvimento das nanoemulsões.....	54
3.3.6.1 Determinação do EHL requerido do óleo essencial de <i>Lantana camara</i> Linn. ....	55
3.3.6.2. Teste de centrifugação.....	57
3.3.6.3 Diagrama Ternário.....	57
3.3.6.4 Caracterização das nanoemulsões.....	59
3.3.7 Teste da atividade anti-leishmania.....	59
3.3.8 Teste da citotoxicidade frente aos macrófagos.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Rendimento do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	62
4.2 Caracterização físico-química do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	63
4.2.1 Índice de Refração.....	63
4.2.2 Medida da Densidade.....	64
4.2.3 Medida do Índice de Acidez.....	64
4.2.4 Medida do pH.....	65
4.2.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	66
4.2.6 Análises espectroscópicas do Óleo Essencial de <i>Lantana camara</i> Linn.....	74
4.2.6.1 Espectroscopia Raman.....	74
4.2.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	77
4.3 EHL requerido para o OELCL e Caracterização das nanoemulsões.....	79
4.4 Teste da atividade anti-leishmania.....	82
4.5 Teste de citotoxicidade frente aos macrófagos.....	84
5 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária não contagiosa causada por protozoários do gênero *leishmania* e é uma das endemias de maior importância no Brasil, uma vez que ocorre em vários estados (Figura 1). A leishmaniose apresenta um caráter antroponótico, sendo transmitida ao homem através da picada de insetos vetores hematófagos. Dentre as espécies, a *Leishmania amazonensis* é uma das mais amplamente distribuídas no Brasil e está associada à leishmaniose tegumentar americana (LTA), uma doença que varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas e apresenta dificuldades para o seu controle devido às suas complexas características epidemiológicas (DORVAL et al., 2006).



**Figura 1.** Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Brasil em 2005. Fonte: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

O tratamento da leishmaniose, segundo Lourenço (2000), utiliza-se de uma pequena variedade de fármacos, sendo um exemplo o uso de antimoniais e o uso da pentamidina. Esses

fármacos além de apresentarem efeitos indesejáveis podem se tornar ineficientes por consequência de os parasitas obterem resistência aos mesmos, devendo-se assim buscar outras formas de tratamento utilizando-se, por exemplo, produtos naturais.

A utilização de plantas medicinais é um meio relevante principalmente para comunidades de baixa renda, devido a sua alta disponibilidade, baixa toxicidade, risco mínimo de efeitos colaterais, aos baixos custos e sem ônus comparados aos medicamentos alopáticos. Essas plantas utilizadas na medicina tradicional estão sendo também cada vez mais estudada por serem possíveis fontes de substâncias com atividades antimicrobianas frente a microrganismos prejudiciais a saúde do homem (BESSA et al., 2013).

O objetivo principal das reações que acontecem nos organismos vivos geralmente é o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Essas reações consideradas como processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidas como integrantes do metabolismo primário. No entanto os vegetais e os microrganismos também são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida, encontrando-se nesse grupo substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específico e único, caracterizando-se como elemento de diferenciação e especialização definindo-se a esse conjunto metabólico de metabolismo secundário (OTTOBELLI e FREITAS, 2011).

Uma vez que a Amazônia possui o maior ecossistema de florestas tropicais do mundo, a busca por princípio ativo das plantas medicinais dessa região tem provocado grande interesse de muitos grupos de pesquisadores, pois se estima que a floresta guarde em suas entranhas a mais fantástica das moléculas capazes de curar as diversas enfermidades que acometem os seres vivos, e com a tecnologia atualmente disponível é possível identificar, testar, modificar e disponibilizar estas substâncias em benefício dos seres vivos (OTTOBELLI e FREITAS, 2011).

Assim, neste trabalho, propõe-se fazer um estudo do óleo essencial da espécie *Lantana camara* Linn com a intenção de obter ativos para o desenvolvimento de fármacos sob a perspectiva da nanociência, em especial a nanobiotecnologia, ainda não pesquisados; uma vez que a presença de compostos com ações farmacológicas diversas como anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antiparasitárias, antifúngicas, na composição da *Lantana camara* Linn tem suscitados trabalhos com o intuito de isolar e estudar esses compostos,



porém, até o presente momento, o potencial nanoestrurado do óleo essencial dessa espécie não foi relatado na literatura.

O objetivo deste trabalho foi extrair das folhas da espécie *Lantana camara* Linn o óleo essencial, calculando o seu rendimento, assim como realizar a caracterização físico-química, obtendo informações da densidade, índice de refração, índice de acidez, os compostos presentes, realizar medidas espectroscópicas em Raman, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cromatografia gasosa acoplada à massa (CG-EM). Foi objetivo também, obter nanoemulsões do óleo essencial e caracteriza-la, e testar o óleo essencial e as nanoemulsões quanto à sua atividade anti-leishmania.

Portanto, a obtenção do óleo essencial, da nanoemulsão, e o estudo da atividade anti-leishmania justificam estudos aprofundados dessa espécie botânica com abordagens nanobiotecnológicas no uso sustentável da biodiversidade brasileira; uma vez que matérias nanoestruturadas como as nanoemulsões são biodegradáveis, biocompatíveis, fáceis de produzir e podem ser utilizadas como veículos para fármacos lipofílicos propensos à hidrólise. As nanoemulsões ainda têm sido estudadas e desenvolvidas para liberação parenteral, oral, ocular, pulmonar e dérmica de fármacos e ativos, além de ser comumente utilizada em produtos cosméticos, como loções para serem aplicadas na pele e no cabelo. O tamanho reduzido das partículas pode cobrir extensa área cutânea e, com isso, é indicada como sistema para liberação de ativos na pele (BERNARDI, 2011).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. Sendo dividida em leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral. Sua transmissão ao homem ocorre por meio de insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos; acontecendo quando um mosquito fêmea infectado passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue. Além do homem esses vetores podem infectar vários mamíferos silvestres e domésticos (FIOCRUZ, 2015).

A leishmaniose visceral ou calazar é um dos tipos mais grave de todos os tipos de leishmaniose. O paciente infectado com essa patologia inicialmente apresentará como sintomas: febre, hemorragias, anorexia, sudorese, fraqueza e emagrecimento. Em estágios mais avançados da doença os sintomas apresentados são esplenomegalia, a hepatomegalia, linfadenopatia e a anemia (LOURENÇO, 2000).

Na leishmaniose tegumentar americana a inoculação da leishmânia causa lesão cutânea no local infectado, podendo evoluir para uma regressão espontânea. No entanto essa infecção pode progredir, surgindo lesões cutâneas disseminadas e invasão ulterior da mucosa nasofaríngea (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

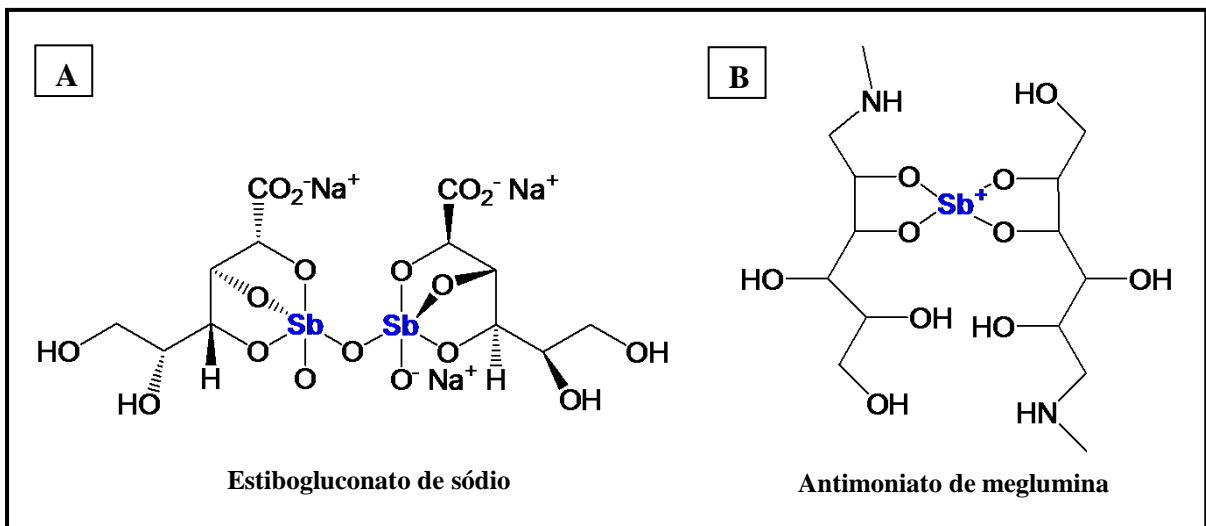
Segundo o Ministério da Saúde (2010) a leishmaniose tegumentar é amplamente distribuída no mundo, sendo registrado no Continente Americano casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, exceto Chile e Uruguai. No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença com diversidade de agentes, reservatórios e vetores, apresentando diferentes padrões de transmissão.

Segundo Silveira et al. (2008) embora na região amazônica seja encontrado 7 espécies de *Leishmania* causadoras da LTA, no entanto, ao considerar o espectro das manifestações encontradas na doença causada pelas espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* pode-se afirmar que essas espécies são as que apresentam o maior potencial de causar doenças ao homem, manifestando-se de forma mais simples como a leishmaniose

cutânea localizada, bem como de forma mais grave, como as lesões cutâneas e/ou de mucosas de difícil tratamento.

Os parasitas do gênero *Leishmania* durante seu ciclo de vida possuem duas formas evolutivas: a forma promastigota, encontrada fora da célula hospedeira e possui flagelo; e a forma amastigota, encontrada dentro da célula hospedeira e não possui movimentos. As promastigotas tem corpo alongado, medem em média entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  e possuem flagelo livre. As amastigotas possuem corpo no formato ovoide, medem em média entre 2,1 e 3,2  $\mu\text{m}$  e têm flagelo interno (FIOCRUZ, Laboratório de Imunomodulação, 2015).

O tratamento da leishmaniose pode ser realizado com a utilização de fármacos como os antimoniais pentavalentes representados pelo antimoniato de meglumina (Glucantime) (Fig. 2 B) e pelo estibogluconato de sódio (Pentosam) (Fig. 2 A), também se faz o uso de pentamidina e anfotericina B. Esses dois últimos são utilizados como segunda escolha devido a efeitos colaterais indesejáveis mais acentuados (LOURENÇO, 2000).



**Figura 2.** Estrutura molecular dos fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose. A) Estibogluconato de sódio. B) Antimoniato de meglumina.

## 2.2 História dos produtos naturais

### 2.2.1 Produtos Naturais

Produtos naturais são produtos de várias fontes naturais como plantas, microrganismos e animais. Os produtos naturais podem ser um organismo inteiro, uma parte de um organismo,

um extrato de um organismo ou de uma parte do organismo, ou composto puro, isolados a partir de plantas, animais ou microrganismos. No entanto, na prática, o termo produto natural refere-se aos metabolitos secundários, moléculas pequenas de peso molecular menor que 1500 Da, produzidos por um organismo, mas que não são estritamente necessários para a sobrevivência do organismo (SARKER e NAHAR, 2007).

### **2.2.2 Produtos naturais no uso medicinal**

O uso de produtos naturais, em especial as plantas, no tratamento de cicatrizações é tão antigo e universal como o próprio medicamento em si. O uso terapêutico de plantas certamente retoma para civilizações sumeriana e acadiana que viveram por volta do terceiro milênio antes de Cristo. Hipócrates (460-377 a.C.), um dos autores mais antigos que descreveu os produtos naturais medicinais de origem vegetal e animal, listou cerca de 400 espécies diferentes de plantas para fins medicinais. Os produtos naturais têm sido uma parte integrante dos antigos sistemas da medicina tradicional, da qual podemos citar a medicina chinesa e a medicina egípcia. O uso terapêutico de plantas ainda continua nos dias atuais, especialmente no Oriente, onde numerosos minerais, substâncias animais e plantas ainda estão em uso comum. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,4 bilhões de pessoas no mundo em desenvolvimento dependem de medicamentos baseados em plantas. Isso nos revela que uma grande parcela dos habitantes do planeta depende principalmente da medicina tradicional para os seus cuidados primários de saúde. Só na China, 7.295 espécies de plantas são utilizadas como agentes medicinais (SARKER e NAHAR, 2007).

A natureza tem sido uma fonte potencial de agentes terapêuticos a milhares de anos. Um número impressionante de drogas modernas foram extraídas de fontes naturais e ao longo do século passado, uma série de drogas foram também desenvolvidas a partir de produtos naturais. Além do uso dos produtos naturais derivado da medicina moderna, os produtos naturais também são utilizados diretamente na indústria farmacêutica "natural" que está a crescer rapidamente na Europa e na América do Norte, assim como em programas de medicina tradicional incorporados nos sistemas de cuidados de saúde primária no México, República Popular da China, Nigéria e outros países em desenvolvimento (SARKER e NAHAR, 2007).

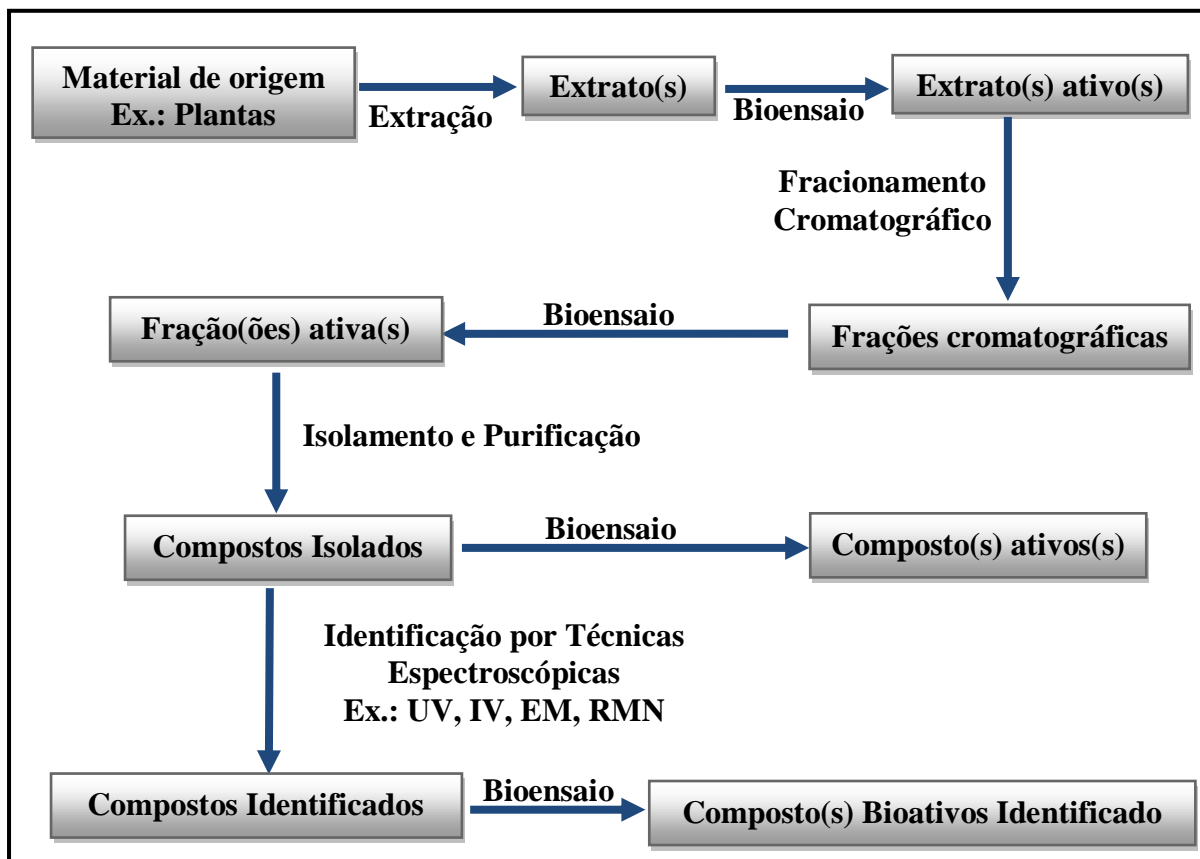
### 2.2.3 O desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais

Embora o desenvolvimento de drogas seja considerado um conceito recente que evoluiu a partir da ciência moderna, na realidade, o desenvolvimento de drogas remonta muitos séculos, e tem suas origens na natureza, quando os seres humanos na busca da cura se voltaram para a Mãe Natureza e descobriram moléculas de drogas únicas. Desta forma o termo produto natural tornou-se quase sinônimo com o conceito de desenvolvimento de drogas. Nos processos da descoberta e desenvolvimento de drogas modernas os produtos naturais tem desempenhado um papel importante na fase inicial da descoberta, ou seja, na descoberta da molécula natural que apresenta o princípio ativo (determinada por vários bioensaios), que em si ou os seus análogos estruturais poderá ser candidato a um fármaco ideal (SARKER e NAHAR, 2007).

Os produtos naturais têm sido uma fonte na produção de drogas. Estima-se que 61% das 877 pequenas novas entidades químicas de moléculas introduzidas como drogas em todo o mundo durante os anos de 1981-2002 podem ser rastreadas ou foram desenvolvidas a partir de produtos naturais, onde 6% são produtos naturais, 27% derivados de produtos naturais, 5% compostos sintéticos derivados de produtos naturais e 23% compostos sintéticos concebidos com base no conhecimento adquirido a partir de um produto natural, ou seja, um mímico do produto natural. Em algumas áreas terapêuticas, a contribuição de produtos naturais é ainda maior, como por exemplo, cerca de 78% das drogas candidatas ao tratamento antibacteriano e 74% das drogas candidata ao tratamento do câncer são produtos naturais ou análogos estruturais de produtos naturais. Em 2000, cerca de 60% de todas as drogas em ensaios clínicos para a multiplicidade de tipos de câncer eram de origens naturais. Em 2001, oito dos 30 medicamentos mais vendidos eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais, e estas oito drogas juntas totalizaram 16 bilhões de dólares em vendas (SARKER e NAHAR, 2007).

No método tradicional do desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais, extratos brutos de drogas são testados, e no caso de uma resposta positiva, onde a partir de qualquer evidência de atividade, o extrato é fracionado e o composto ativo é isolado e identificado. Cada passo do fracionamento e do isolamento geralmente é guiado por bioensaios, e o processo é chamado de isolamento guiado por bioensaios. A Figura 2

apresenta uma visão geral do processo tradicional de desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais (SARKER e NAHAR, 2007).



**Figura 3.** Método tradicional de descoberta de drogas a partir de produtos naturais.  
Fonte: SARKER e NAHAR, 2007 (adaptado).

Pesquisas por novas entidades químicas bioativas (bioNCEs) têm adotado novas técnicas, como o uso da química combinatória, obtendo assim um maior número de substâncias. Com esta nova tecnologia, as reações são feitas em várias etapas, ocorrendo em paralelo ou em misturas, a partir de poucos reagentes. Os produtos reacionais resultantes são combinações aleatórias dos reagentes e, portanto, um número muito grande de compostos novos pode ser gerado (VIEGAS JR et al., 2006).

Ao mesmo tempo surgiu também o desenvolvimento de métodos de “screening” biológicos automatizados (“high throughput screening”– HTS), que passaram a permitir a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento. Estas técnicas, empregadas concomitantemente, permitem a identificação de novos compostos capazes de interagirem com os alvos-terapêuticos ensaiados em escala, inicialmente, micro molar e, atualmente, nano molar. Cabe mencionar que graças ao emprego destas estratégias combinadas surgiu o termo

“hit”, definindo uma nova substância identificada pelo emprego destas estratégias, isto é, ativa *in vitro* sobre um alvo determinado, na escala indicada (VIEGAS JR et al., 2006). A fim de incorporar os produtos naturais nos programas HTS modernos, uma biblioteca de produtos naturais (uma coleção de produtos naturais desreplcado) precisa ser construído. Desreplcação é o processo pelo qual se pode eliminar a recorrência ou o re-isolamento de compostos iguais ou semelhantes a partir de diferentes extratos. Um número de técnicas combinadas é utilizado para desreplcação, por exemplo, cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos (CL-DAF), cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL-EM) e cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear (CL-RMN) (SARKER e NAHAR, 2007).

Na Figura 3 é apresentada uma visão geral do processo moderno de descoberta de drogas a partir de produtos naturais.

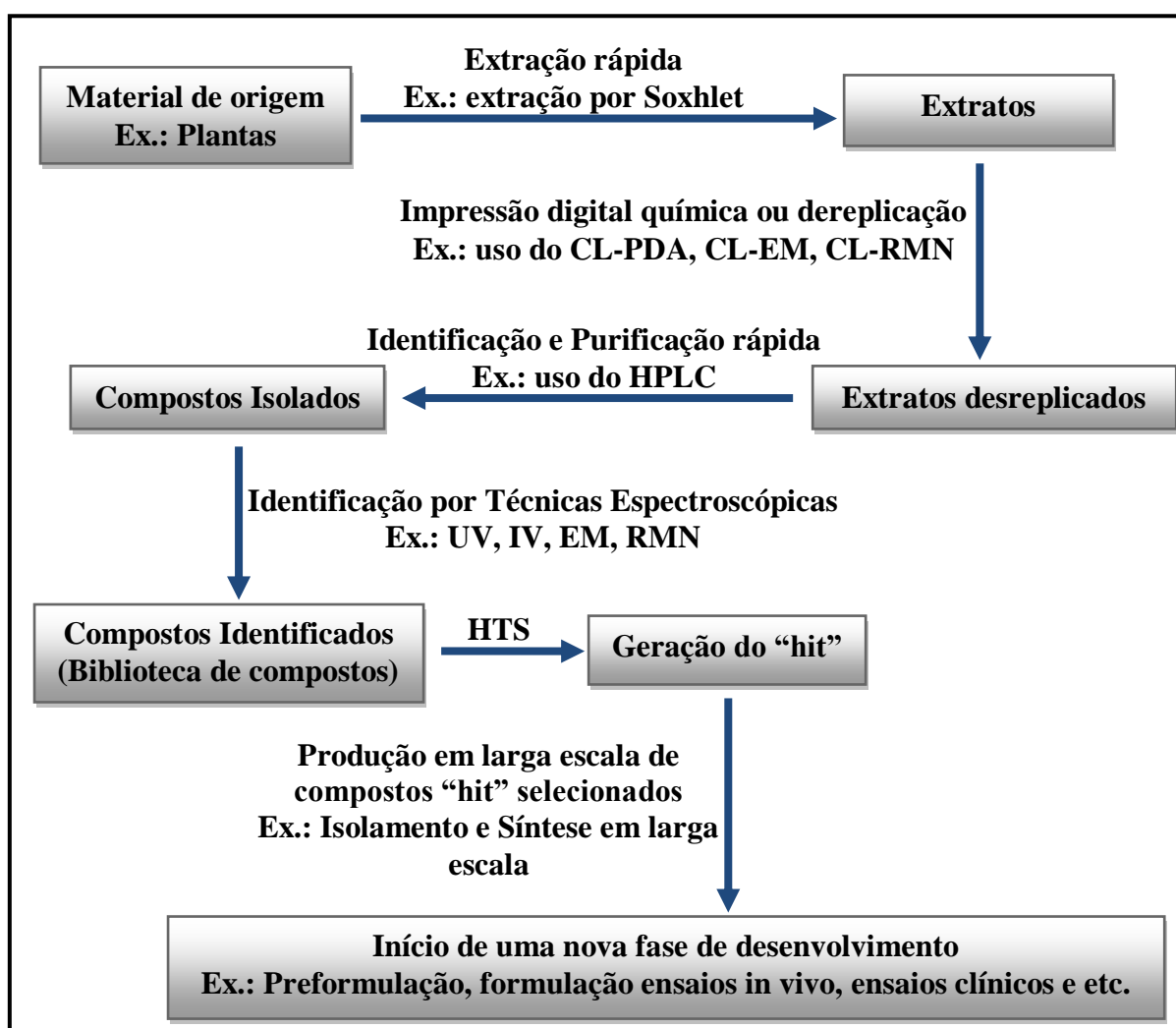


Figura 4. Método moderno de descoberta de drogas a partir de produtos naturais.  
Fonte: SARKER e NAHAR, 2007 (adaptado).

#### 2.2.4 Metabolismo secundário

As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como metabolitos primários e secundários, embora os limites precisos entre os dois grupos em alguns casos sejam um pouco confuso. Os metabolitos primários são compostos que têm papéis essenciais associados com a fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Nesta classe estão incluídos os lípidos, nucleótidos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Outros compostos fitoquímicos, muitos dos quais se acumulam em altas concentrações em algumas espécies, são referidos como metabólitos secundários. Estes são estruturalmente diferentes e muitos são distribuídos entre um número muito limitado de espécies dentro do reino vegetal (CROZIER et al., 2006).

Os metabólitos secundários expressam a individualidade de uma determinada espécie em termos químicos e respondem por inúmeras funções na proteção, desenvolvimento e interação com o meio-ambiente (EMERY et al., 2010). Dentre as funções desenvolvidas pelos metabólitos secundários podemos citar a proteção contra a infecção microbiana, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, agentes alelopáticos, protetores de UV; como também despertam interesse devido à sua utilização como corantes, fibras, colas, óleos, ceras, agentes aromatizantes, medicamentos, perfumes, e possíveis fontes potenciais de novas drogas, antibióticos, inseticidas e herbicidas (CROZIER et al., 2006).

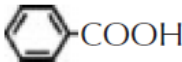
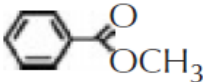
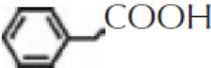
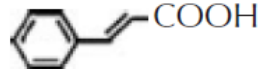
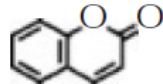

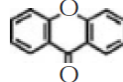
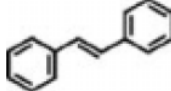
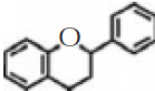
Segundo Crozier et al. (2006) os metabólitos secundários de plantas podem ser divididos em três grupos principais com base nas suas origens biossintéticas: (i) compostos fenólicos e polifenólicos, (ii) terpenos e terpenóides e (iii) os alcalóides.

Os compostos fenólicos apresentam uma grande variedade estrutural e tem por característica a presença de um grupamento hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. Neste grupo estão presentes os flavonoides, presentes no vacúolo das plantas, a exemplo da quercetina que é encontrada nas cascas das frutas; os taninos, que conferem sabor adstringente às folhas de plantas lenhosas, como o ácido digálico; as ligninas, superadas apenas pela celulose em abundância na natureza, são polímeros que conferem rigidez, resistência e impermeabilidade à parede celular de plantas (EMERY et al., 2010).

Na Tabela 1 são apresentados alguns esqueletos estruturais de compostos fenólicos e polifenólicos.

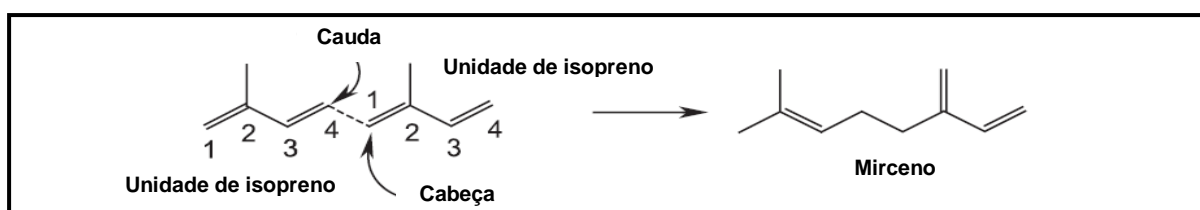


**Tabela 1:** Esqueletos estruturais de compostos fenólicos e polifenólicos (o grupo hidroxila não é mostrado)

Número de Carbonos	Esqueleto	Classificação	Exemplo	Estrutura Básica
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	ácido gálico	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas	Galacetofenona	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácido fenilacético	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos	ácido <i>p</i> -cumárico	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas	Esculetina	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas	Mangiferina	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonóides	Naringenina	

Fonte: CROZIER et al., 2006

Terpenos são compostos derivados de uma combinação de duas ou mais unidades de isopreno. O isopreno é uma unidade de cinco átomos de carbono, quimicamente conhecida como 2-metil-1,3-butadieno. De acordo com a regra do isopreno proposta por Leopold Ruzicka, os terpenos surgem a partir da união da cabeça com a cauda de unidades de isoprenos. O carbono 1 do isopreno é chamado de cabeça, enquanto o carbono 4 é chamado de cauda (Fig. 5). Por exemplo, o mirceno é um terpeno simples contendo 10 carbonos, formado a partir da união da cabeça com a cauda de duas unidades de isopreno como mostra a Figura 5 (SARKER e NAHAR, 2007).



**Figura 5.** Formação de terpenos a partir de unidades de isoprenos.

Fonte: SARKER e NAHAR, 2007.

Os terpenos possuem esqueletos de 10, 15, 20, 30 ou 40 átomos de carbono, sendo conhecidos, respectivamente, como *mono*, *sesqui*, *di*, *tri* e *tetraterpenos* (Fig. 6) com as mais diferentes formas estruturais. Quando a estrutura contém oxigênio são chamados de terpenóides. Existem mais de 20000 terpenos e terpenoides conhecidos, produzidos por vegetais e outros organismos terrestres e marinhos, inclusive animais, fungos e bactérias. Muitos monoterpenos e sesquiterpenos, por serem compostos voláteis, compõem os óleos essenciais (EMERY et al., 2010).

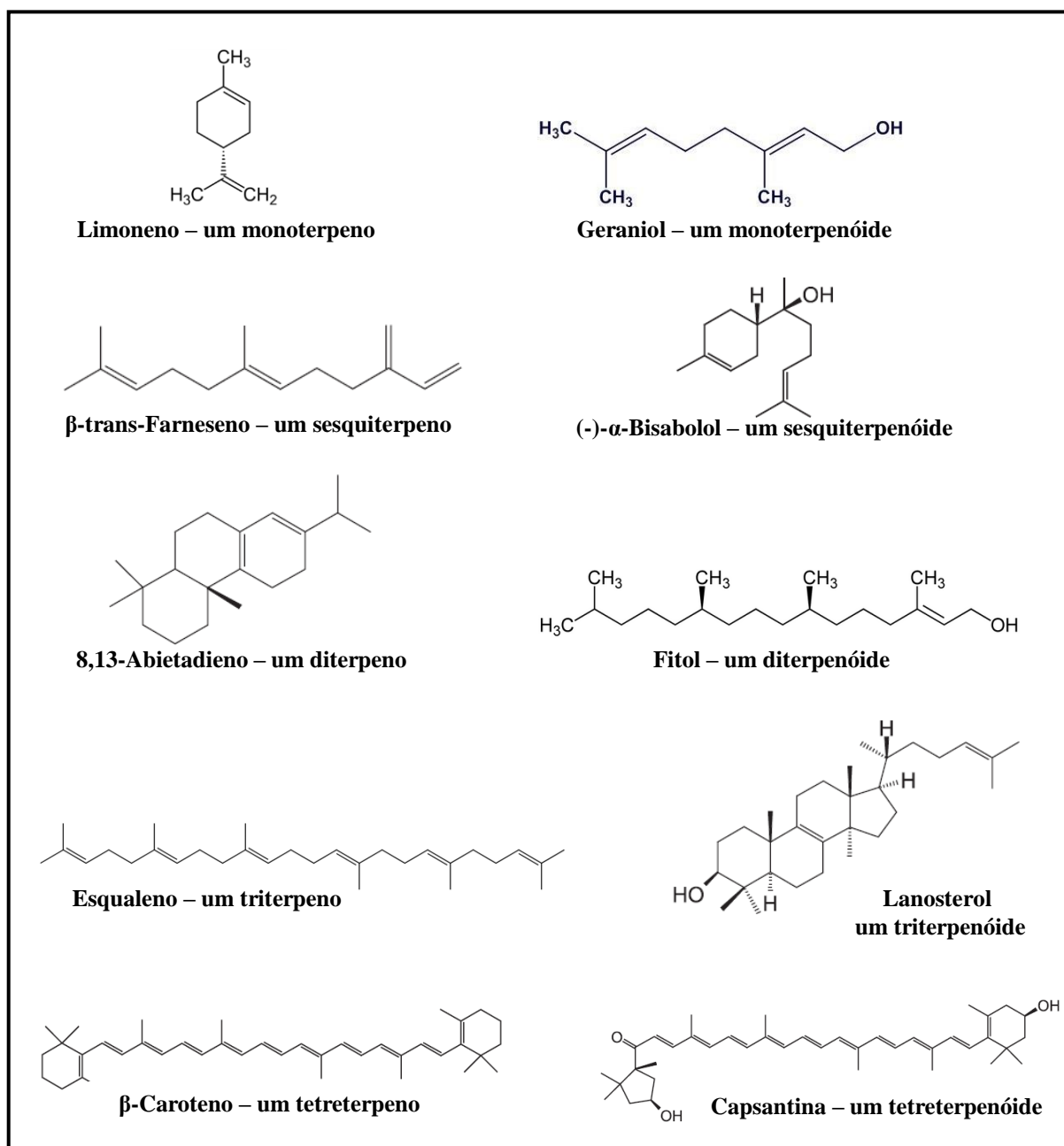
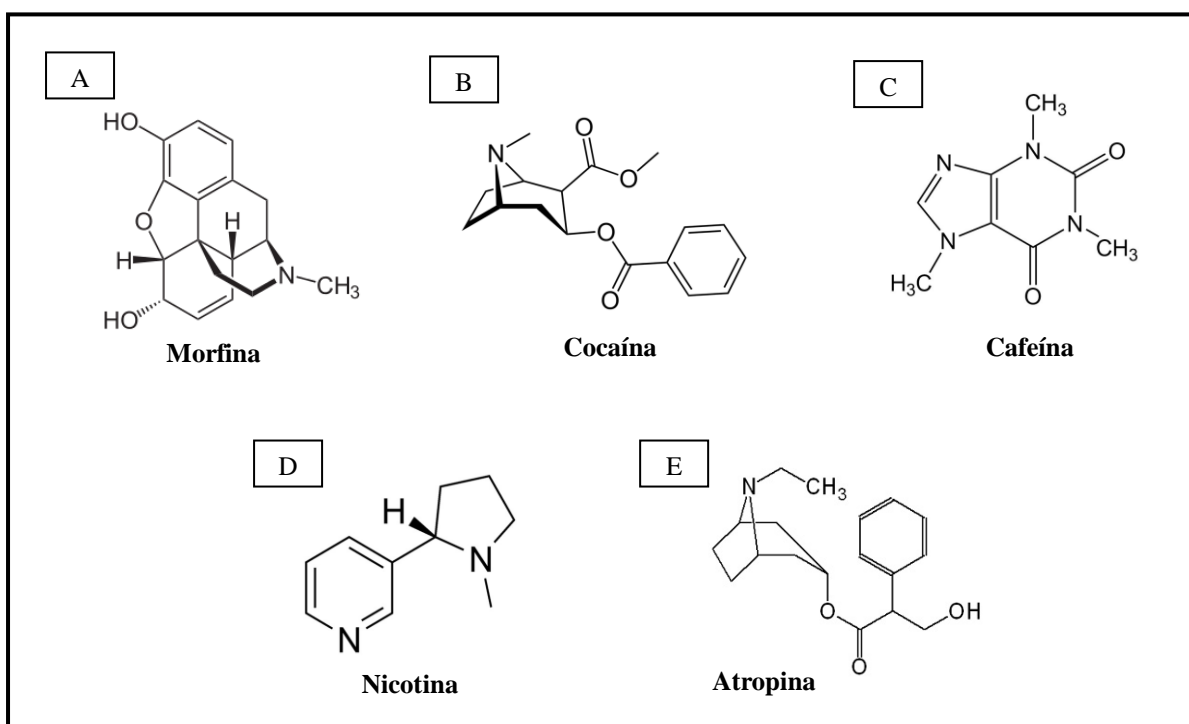


Figura 6. Terpenos e terpenóides

Os alcaloides são compostos nitrogenados que podem ter origem microbiana, vegetal ou de animais, tanto terrestres como marinhos. Muitos são conhecidos pelo sabor amargo e por suas propriedades básicas (de álcali), apesar de não serem características comuns a todos os compostos desta classe. Boa parte desta família é derivada de aminoácidos e assim como os terpenos constitui uma classe ampla e diversificada em termos estruturais. Como exemplo de alcaloides temos a morfina (Fig. 7A), obtida da papoula, a cocaína (Fig. 7B), a cafeína (Fig. 7C), estimulante encontrado no café, a nicotina (Fig. 7D), isolada do tabaco, e a atropina (Fig. 7E), isolada da beladona (EMERY et al., 2010).



**Figura 7.** Estrutura molecular de alguns alcaloides.

### 2.3 *Lantana camara* Linn

*Lantana camara* Linn é uma planta do gênero *Lantana* (Verbenácea) que de acordo com estudos desenvolvidos por Linnaeus em 1753 continha sete espécies, sendo seis da América do Sul e uma da Etiópia (GHISALBERTI, 2000). Plantas do gênero *Lantana* são nativas principalmente da América tropical e subtropical, mas algumas variedades são nativas da Ásia tropical e África, ocorrendo agora em aproximadamente 50 países (GHISALBERTI, 2000).

*Lantana camara* Linn (Figura 8), vulgarmente conhecida no Brasil como camará, cambará, camará-de-cheiro, camará-de-espinho, cambará-de-cheiro, cambará-de-chumbo, cambará-de-espinho, cambará-miúdo, cambará-verdadeiro e cambará-vermelho é a espécie mais comum do gênero, crescendo exuberantemente em altitudes de até 2000 m em regiões subtropicais e temperadas tropicais. É uma planta lenhosa dispersa com várias cores de flores: vermelho, rosa, branco, amarelo e violeta. Os caules e ramos, por vezes, estão armados com espinhos (GHISALBERTI, 2000). Trata-se de uma planta de porte herbáceo, ornamental, constituída de folhas ovais-oblongas, acuminadas, sub-cordadas, serreado-crenadas, de cor verde-escura na face superior e mais clara na inferior, apresentando um cheiro muito aromático, agradável, quando frescas. Por seu caráter ornamental ela foi espalhada pelos colonizadores da América Tropical a outros países, tornando-se uma das mais importantes plantas daninhas do mundo (GHISALBERTI, 2000).



**Figura 8.** *Lantana camara* Linn: (A) planta com flores e frutos. (B) planta e suas inflorescências. (C) folhas, flores e frutos. Foto: Antonio O. da Costa.

*Lantana camara* Linn. tem sido reportada para vários usos na medicina herbal. A planta foi usada para tratamento de tumores, febre, gripe, dor de estômago, feridas, catapora, sarampo, reumatismos, asma, pressão alta, bronquite, úlceras, vermífugo, sudorífico, carminativo, antisséptico, antiespasmódico, tônico, coceiras, cortes, edemas, febre biliar, catarro, eczema, disenteria, fístula, pústulas, tétano, malária, dor de dente, dor de cabeça, hemorragia uterina, lesões oculares, coqueluche, (GHISALBERTI, 2000; SONIBARE e EFFIONG, 2008; DEENA e THOPPIL, 2000; SINGH e TIWARI, 2011).

Estudos realizados com o Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn (OELCL) têm demonstrado que o mesmo apresenta atividades antifúngicas e antibacterianas contra várias espécies. Na Tabela 2 encontram-se um levantamento realizado das atividades biológicas relatadas na literatura científica.

**Tabela 2:** Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn.

<b>Atividade</b>	<b>Organismo/Espécie</b>	<b>Referência</b>
Adulticida	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Anopheles culicifacies</i> , <i>Anopheles fluviatilis</i> e <i>Anopheles stephensi</i>	DUA et al., 2010
	<i>Candida albican</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Bacillus aureus</i>	SONIBARE e EFFIONG, 2008
	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>	DEENA e THOPPIL, 2000
Antibacteriana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	SAIKIA e SAHOO, 2011
	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SOUSA et al., 2012
	<i>Corynebacteriaceae</i> spp.	ALITONOU et al., 2004
	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. cholerae</i>	COSTA et al., 2009
	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	KUMARASAMYRAJA et al., 2012
Antifúngica	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Alternaria brassicicola</i>	DEENA e THOPPIL, 2000
	<i>Saccharomyces</i> spp., <i>Sporobolomyces</i>	ALITONOU et al., 2004
	<i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i>	MEDEIROS et al., 2012
Carapaticida	<i>Amblyoma variegatum</i>	ALITONOU et al., 2004
	<i>Artemia salina</i>	SONIBARE e EFFIONG, 2008
Citotóxicidade	<i>Artemia salina</i> , macrofágos	MACHADO et al., 2012
	<i>Artemia salina</i>	COSTA et al., 2009
	<i>Artemia salina</i>	MEDEIROS et al., 2012
Fumigante (inseticida)	<i>Sitophilus granarius</i>	ZOUBIRI e BAALIOUAMER, 2012
Fungistática	<i>Torulopsis cândida</i> , <i>Hansenula</i> spp.	ALITONOU et al., 2004
Larvicida	<i>Aedes aegypti</i>	TEIXEIRA et al., 2010
Gastroprotetora	Camundongos Swiss	SANTANA et al., 2014
Leishmanicida	<i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i>	MACHADO et al., 2012

Os principais constituintes químicos do OELCL reportados na literatura são o (-) -espatulenol, (-) - $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno, davanone,  $\delta$ -Guaieno, D-nerolidol, germacreno D, limoneno, óxido de cariofileno, sabineno, valeceno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -cadineno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno,  $\gamma$ -elemeno (JAWONISI e ADOGA, 2013; KHAN et al., 2002; SAIKIA e SAHOO, 2011; SANTANA et al., 2014; SILVA, et al., 1999; SOUSA et al., 2012.).

## 2.4 Óleo essencial

Óleos essenciais (OEs) são mistura complexa de compostos naturais, caracterizados por um forte odor e são sintetizado por plantas aromáticas como metabólitos secundários (FARIA, 2008). Algumas dessas plantas são de grande interesse e entre outras qualidades possuem diversas propriedades biológicas. O termo "biológico" compreende todas as atividades que estas misturas de compostos orgânicos voláteis (principalmente mono e sesquiterpenoides, benzenóides, fenilpropanóides, etc.) exercem sobre os seres humanos, animais e outras plantas (BASER e BUCHBAUER, 2010).

Os OEs são menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em baixas concentrações, em glândulas especiais da planta, denominadas tricomas (SILVEIRA et al., 2012). Os OEs podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

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

Eles são normalmente obtidos por arraste a vapor ou hidrodestilação, técnica desenvolvida pela primeira vez na Idade Média pelos árabes. Conhecido por suas propriedades antissépticas, ou seja, bactericida, virucida e fungicida, e também pela sua fragrância e pelas propriedades medicinais, os OEs são utilizados na preservação de

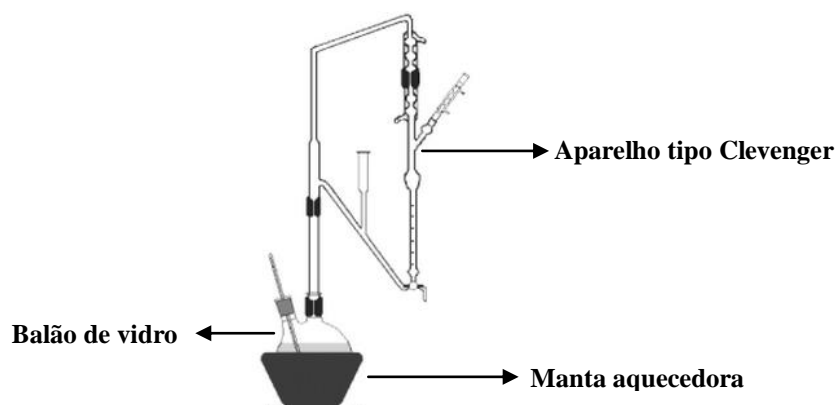
alimentos, como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, medicamentos anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolítico (BAKKALI et al., 2008; MEDRANO e RODRIGUEZ, 2014).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado e tropicais, onde eles representam uma parte importante da farmacopeia tradicional.

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

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

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



**Figura 9.** Extrator de Clevenger Modificado.  
Fonte: SILVA et al., 2003.

A destilação por arraste a vapor é uma operação unitária, utilizada principalmente para materiais sensíveis à temperatura, sendo baseada na diferença de volatilidade de determinados compostos presentes na matéria-prima vegetal. Na extração por arraste a vapor utiliza-se uma caldeira para geração de vapor, um extrator (destilador), onde será colocada a matéria prima de onde será extraído o óleo, um condensador e um frasco de coleta (vaso florentino). O vapor é percolado através do leito de sólidos, no interior do vaso extrator, arrastando o óleo essencial. A mistura vapor-óleo segue então para o condensador, onde ocorre a mudança de fase. O condensado é alimentado no vaso florentino, onde ocorre a separação das fases. Posteriormente o óleo essencial é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade (SILVEIRA et al., 2012).

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

A extração com fluido supercrítico tornou-se um foco de interesse no campo da extração de compostos de origem de produtos naturais, uma vez que o fluido supercrítico tem vantagens como excelentes propriedades de transferência de massa, facilidade de controle de solubilidade pela temperatura e pressão. Um dos fluidos supercríticos mais utilizados é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), isso ocorre devido a sua temperatura crítica ser próxima da temperatura ambiente, assim como o mesmo apresenta ausência de problemas residuais, é barato, inodoro, incolor, não tóxico, não inflamável e não corrosivo (GOTO et al., 1993).

A formação de um fluido supercrítico se dá sempre que uma substância é submetida a uma temperatura e pressão acima de sua temperatura e pressão crítica, sendo a temperatura crítica aquela acima da qual uma substância não pode ser liquefeita. Nessas condições a substância não pode mais ser condensada como um líquido aumentando-se a sua pressão. Como exemplo o  $\text{CO}_2$  possui temperatura crítica de  $31\text{ }^\circ\text{C}$  e pressão crítica de  $79,2\text{ atm}$ , e nesse estado suas moléculas atuam independentemente umas das outras, assim como fazem



em um gás. Ainda nessas condições, a densidade de um fluido supercrítico é de cerca de 200 a 400 vezes aquela do seu estado gasoso e próxima à do seu estado líquido (SKOOG et al., 2006).

As propriedades de transporte de qualquer fluido supercrítico dependem fortemente de sua densidade, o que por sua vez, é sensível à pressão e a temperatura. Uma regra empírica útil é que a solubilidade de um soluto é uma função exponencial da densidade do fluido supercrítico, de modo que pequenos aumentos na pressão, em particular as próximas do ponto crítico, podem ter grandes efeitos sobre a solubilidade (ATKINS e DE PAULA, 2006).

Desta forma extração por fluidos supercríticos apresenta a característica do meio extrator ser um gás, porém com elevada densidade de modo que há interações polares e com isso a seletividade do poder extrativo são muito mais intensas, do que um gás comum e a difusão de outras substâncias nele, mais reduzida (MAUL et al., 1996).

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

## 2.5 Colóides

Colóides são misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida (sólido, líquido ou gás) dispersa na fase contínua (sólido, líquido ou gás) (JUNIOR e VARANDA, 1999). A ciência dos colóides se ocupa com o estudo dos sistemas nos quais um ou mais componentes da mistura apresenta uma dimensão no intervalo de 1 a 1000 nanômetros (SHAW, 1975).

Os principais fatores que contribuem para a natureza de um colóide são as dimensões de suas partículas, a forma e flexibilidade da partícula, as propriedades da superfície e as interações partícula-partícula e partícula-solvente (SHAW, 1975).

Os sistemas coloidais podem ser agrupados em dispersões coloidais; soluções verdadeiras de substâncias macromoleculares e colóides de associação. Em uma dispersão coloidal as partículas dispersas são suficientemente grandes para permitirem a existência de superfícies de separação entre fase dispersa e a fase contínua (SHAW, 1975).

Na Tabela 3 são apresentados os tipos de dispersões coloidais. Os princípios relacionados com os diferentes sistemas coloidais baseiam-se em propriedades comuns a todos os colóides, como o tamanho e a elevada relação área/volume das partículas (SHAW, 1975). Em uma dispersão coloidal quando as partículas dispersas apresentam tamanhos diferentes, esse sistema é denominado polidisperso. Já os sistemas com partículas de um mesmo tamanho são denominados monodispersos. Como a área de superfície da fase dispersa é elevada devido ao pequeno tamanho das partículas, as propriedades da interface entre as duas fases — dispersa e de dispersão — determinam o comportamento dos diferentes sistemas coloidais (JUNIOR e VARANDA, 1999).

**Tabela 3:** Classificação dos colóides de acordo com as fases dispersa e de dispersão.

Colóide	Fase dispersa	Fase de dispersão	Exemplo
Aerossol líquido	Líquido	Gás	Neblina, desodorante
Aerossol sólido	Sólido	Gás	Fumaça, poeira
Espuma	Gás	Líquido	Espuma de sabão e de combate a incêndio
Espuma sólida	Gás	Sólido	Isopor®, poliuretana
Emulsão	Líquido	Líquido	Leite, maionese, manteiga
Emulsão sólida	Líquido	Sólido	Margarina, opala, pérola
Sol	Sólido	Líquido	Tinta, pasta de dente
Sol sólido	Sólido	Sólido	Vidro e plástico pigmentado

Fonte: JUNIOR e VARANDA, 1999.

### 2.5.1 Emulsões

Uma emulsão consiste de dois líquidos imiscíveis (usualmente óleo e água), com um dos dois líquidos disperso em forma de pequenas gotas esféricas no outro (BECHER, 2001). As emulsões podem ser convenientemente classificadas de acordo com a distribuição da

quantidade relativa do óleo e da fase aquosa. Um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo-em-água (O/A), enquanto o sistema que consiste de gotas de água dispersas na fase oleosa é chamado emulsão água-em-óleo (A/O).

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

De acordo com Tadros (2013) as emulsões podem se classificadas a partir da sua forma estrutural (tamanho e forma das gotículas) da seguinte maneira:

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

### 2.5.1.1 Nanoemulsões

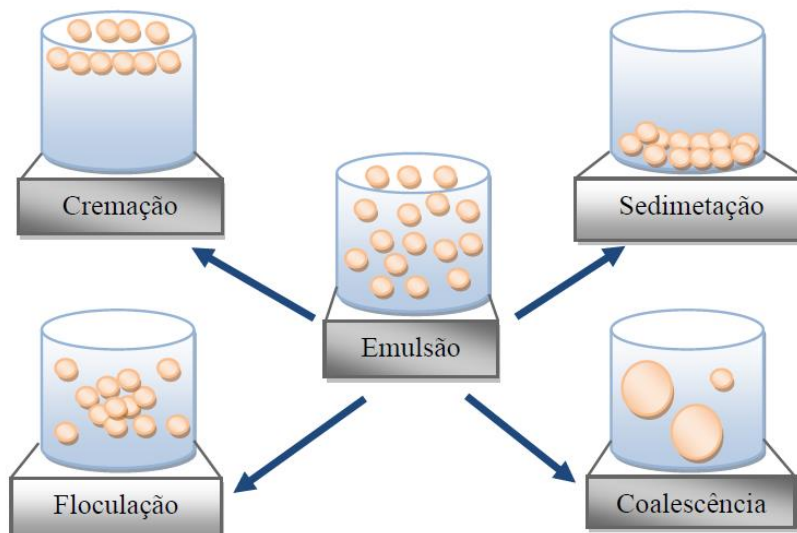
As nanoemulsões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O); são definidas como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável com pequenas gotas esféricas de raio  $r < 100$  nm (MCCLEMENTS, 2012).

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

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

- Apresentam grande redução no efeito da força da gravidade e do movimento Browniano. Isto significa que não haverá cremação ou sedimentação durante o armazenamento, o que ocorre frequentemente nas macroemulsões. Chama-se de cremação a separação dos componentes da emulsão baseada na densidade da fase oleosa e aquosa. A cremação é um processo considerado indesejável (BECHER, 2001). A sedimentação ocorre quando as gotículas dispersas se precipitam devido a apresentar uma densidade maior que a fase contínua (BECHER 2001);
- Evita a floculação, ou seja, permite ao sistema a permanência da dispersão sem que haja separação de fases. A floculação refere-se ao processo em que dois ou mais conjuntos de gotículas comportam-se cineticamente como uma unidade, porém as gotículas individuais conservam a sua identidade (PETSEV et al., 1995; VERWEY e OVERBEEK, 1948);
- Evita a coalescência uma vez que as gotas não são deformáveis e não existem flutuações na superfície. A coalescência é a colisão e conseqüentemente a fusão irreversível de duas gotas e assim sucessivamente onde o fim da coalescência é a completa separação de fases (KABALNOV e WENNERSTROM, 1996);
- Permite depositar os substratos uniformemente na pele (SOLANS et al., 2005; TADROS et al., 2004);
- Permite penetração através da superfície da pele ajudando na entrada dos compostos ativos (SOLANS et al., 2005; TADROS et al., 2004);
- Permite uma rápida penetração dos compostos ativos devido a grande área superficial de contato (SOLANS et al., 2005; TADROS et al., 2004).

Na Figura 10 estão representados os processos de cremação, sedimentação, flocculação e coalescência. Esses processos conduzem a instabilidade de uma emulsão (JATO, 1997).



**Figura 10.** Processos que conduzem a instabilidade de uma emulsão. Adaptado de TADROS et al.,2004.

#### 2.5.1.1.1 Formação de nanoemulsão

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

Sabe-se que a quantidade de energia necessária para a formação das nanoemulsões é variável, exigindo métodos de alta energia de emulsificação e de baixa energia. Podemos citar a ocorrência de uma área de investigação que estuda a formação de nanoemulsões de baixa energia (GUPTA e CANNON, 2000; MILLER, 2006).

Entre os métodos que podem ser aplicados para a preparação de nanoemulsões, podemos citar o uso de alta pressão de homogeneização, homogeneização ultrassônica e o método de temperatura de inversão de fases (PIT).

Os homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados na indústria para a preparação de nanoemulsões (SOLANS et al., 2003; JAFARI et al., 2006). Geralmente trabalham em um intervalo de pressão que vai de 50 a 100 Mpa, sendo reportado também o uso de um instrumento que alcança pressões de 350 MPa. (FLOURY et al., 2003). No entanto

as pressões altas não podem ser utilizadas para todo tipo de nanoemulsões, por exemplo, os sistemas O/A que utilizam metilcelulose como um emulsionante só poderão ser estabilizado com um homogeneizador de baixa pressão (150 MPa), pois, devido ao forte fluxo de alongação produzido em pressões mais altas promovem a degradação irreversíveis das moléculas de cadeia longa.

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

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

O método de inversão de fases por temperatura, método PIT introduzido por Shinoda e Saito, (1968) é amplamente usado na indústria. Este método se baseia em formar a emulsão utilizando uma mudança brusca de temperatura. No entanto, seu uso está limitado a sistemas formulados com surfactantes não iônicos do tipo etoxilado, os quais sofrem variações de seu balanço hidrofílico-lipofílico com a temperatura, ou seja, a temperaturas inferiores à temperatura de inversão de fases se formam nanoemulsões óleo-em-água enquanto que às temperaturas superiores a mesma se formam nanoemulsões água-em-óleo (SHINODA e KUNEIDA, 1983).

#### **2.5.1.1.2 Estabilidade das nanoemulsões**

Do ponto de vista termodinâmico, em um sistema bifásico, a fase dispersa consiste de gotículas nanoscópicas, usualmente com um intervalo de tamanho menor que 100 nm de diâmetro, tais dispersões nunca são completamente estáveis no sentido absoluto, porque a

interface entre as fases é o lugar de energia livre superficial, e se duas gotículas estão juntas há uma redução líquida na área interfacial.

As nanoemulsões são sistemas instáveis devido ao contato entre as moléculas de água e do óleo não serem favoráveis termodinamicamente.

A variação de energia livre associada com a formação da nanoemulsão determina se uma nanoemulsão é ou não termodinamicamente estável, porém essa medida não é útil para determinar a velocidade com que as propriedades de uma nanoemulsão variam através do tempo e nem o tipo de variações que podem ocorrer, ou os mecanismos físicos responsáveis por estas mudanças.

A variação da energia livre de Gibbs  $\Delta G$  associada para formação de um sistema nanoemulsionado a partir de seus constituintes separados (fase oleosa e fase aquosa), segundo McClements (2012), pode ser calculada pela expressão:

$$\Delta G_{\text{formação}} = \Delta G_I - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

onde  $\Delta G_{\text{formação}}$  é a energia livre de formação,  $\Delta G_I$  é a energia livre de interface,  $T$  é a temperatura absoluta do sistema e  $\Delta S$  é a variação de entropia do sistema.

O termo  $\Delta G_I$  é sempre positivo, uma vez que o aumento na área de contato e a tensão interfacial são positivos. Assim, este termo sempre se opõe à formação de dispersões coloidais (MCCLEMENTS, 2012).

O termo  $T \cdot \Delta S$  é depende do número de formas diferentes que a fase de oleosa pode ser disposta no interior do sistema. Desta forma o termo  $T \cdot \Delta S$  é sempre negativo, já que o número de arranjos acessíveis para a fase oleosa num estado emulsionado é muito maior do que num estado não emulsionado, e, por conseguinte, sempre favorece a formação de dispersões coloidais (MCCLEMENTS, 2012).

Em termos práticos o sinal da energia livre de formação  $\Delta G_{\text{formação}}$  indicará se a reação para a formação de um sistema nanoemulsionado é espontânea ou não. Para  $\Delta G_{\text{formação}} < 0$ , a reação é espontânea e o sistema é dito termodinamicamente estável; enquanto para  $\Delta G_{\text{formação}} > 0$ , a reação não é espontânea e o sistema é dito termodinamicamente instável.

A informação sobre a dependência do tempo na estabilidade de nanoemulsões é um dado particularmente importante para as pesquisas em alimentos, fármacos e cosméticos, pois necessitam criar produtos que retenham suas propriedades desejáveis por um tempo suficientemente longo sob uma variedade de diferentes condições ambientais. Por esta razão,

os investigadores se interessam mais na estabilidade cinética das nanoemulsões do que em sua estabilidade termodinâmica (MCCLEMENTS, 1999).

A importância dos efeitos cinéticos se destaca ao comparar a estabilidade em longo prazo das emulsões com a mesma composição, porém com diferentes tamanhos de gota. Uma emulsão que contém gotas pequenas usualmente tem uma maior vida de prateleira (maior estabilidade cinética) que uma que contenha gotas grandes, ainda que seja mais instável termodinamicamente (porque tem uma área interfacial maior) (MCCLEMENTS, 1999).

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

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

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

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

#### **2.5.1.1.3 Potencial zeta**

O potencial zeta ( $\zeta$ ) pode ser definido como a diferença de potencial existente entre a fronteira da superfície de uma partícula individual e seus íons associados, sendo uma medida útil para a detecção da magnitude de interações atrativas e repulsivas entre coloides e comumente utilizada para avaliação da estabilidade de sistemas nanocarreadores (ZHONG et



al., 2012). A estabilidade desses sistemas pode ser afetada por alterações no pH e/ou na força iônica, e quanto mais elevado for o módulo do potencial zeta maior será a estabilidade da dispersão (TAKEDA et al., 2012).

O valor do potencial zeta ( $\zeta$ ) não pode ser medido diretamente, sendo a medida deste parâmetro determinada com o uso de técnicas de eletroforese, onde o material a ser analisado é submetido à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE, 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003). Nesse método um feixe de luz incide sobre a amostra na qual é aplicada um campo elétrico de força conhecida, que faz com que as partículas, carregadas, se desloquem com velocidades distintas, induzindo diferentes deslocamentos da frequência do feixe de luz, que são convertidos para valores de mobilidade eletroforética (MALVERN INSTRUMENTS, 1996).

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

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

#### **2.5.1.1.4 Fatores de estabilidade das nanoemulsões**

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

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

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

O fenômeno de maturação de Ostwald é o processo pelo qual as gotas grandes crescem à custa das menores pelo transporte de massa da fase dispersa de uma gota para a outra através da fase contínua intermediária (MCCLEMENTS, 2005).

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

Se existe alguma difusão do conteúdo da fase dispersa o tamanho das gotas grande aumentará às custas das pequenas e a média da distribuição de tamanho aumentará continuamente. Este efeito foi descrito por Lifshitz e Slyozov (1961). E de maneira independente por Wagner (1961).

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

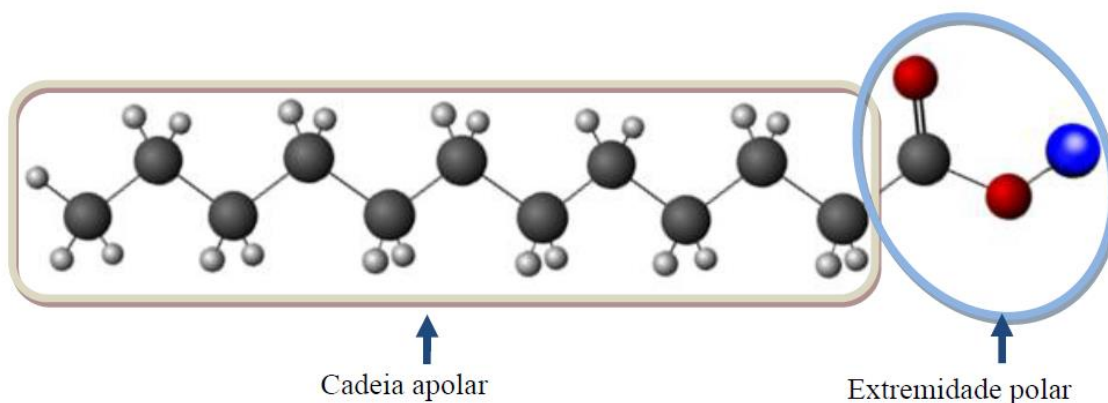
Contudo, esta segregação interna será oposta termodinamicamente a pressão osmótica e atuará para limitar as diferenças entre as gotas e posteriormente se alcançará o equilíbrio. Este princípio tem sido aplicado com sucesso com hidrocarbonetos (TAYLOR, 1998) e em emulsões com fluoretos de carbono (SHARMA et al., 1988; WEERS et al., 1994).

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

#### **2.5.1.1.5 Agentes emulsificantes**

Um aspecto fundamental na formação de nanoemulsões é o uso de emulsificantes, os quais são moléculas com atividade superficial que se adsorvem na superfície das gotas durante a homogeneização, formando uma membrana protetora que previne a agregação das

gotas e ainda diminuem a tensão superficial na interface. A maioria dos emulsificantes são moléculas anfifílicas, ou seja, contem regiões polares e apolares na mesma molécula (DICKINSON, 2003) como se mostra na Figura 11.



**Figura 11.** Molécula anfifílica.

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

- Devem reduzir a tensão interfacial em torno de 5 dinas/cm em emulsões preparadas com agitação (YUAN et al., 2007);
- Devem formar uma película não aderente que não se dilua quando duas gotas colidam, não permitindo a floculação ou a coalescência (KOBAYASHI et al., 2002);
- Deve ter estrutura molecular específica com terminação polar para atrair a água ou terminação apolar para atrair o óleo (SCHRÖEDER e SCHUBERT, 1999);
- Deve ser mais solúvel na fase contínua de forma a adsorver-se rapidamente em torno das gotas da nanoemulsão (WALSTRA e DERKER, 1996);
- Mostrar capacidade para emulsificar o sistema requerido com pequenas concentrações de emulsificante (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004).
- Deve ser relativamente econômico, deve ser seguro e não tóxico (TADROS et al., 2004).

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

Um fator importante no desenvolvimento de nanoemulsões é o tipo de emulsificante, os mais comuns são conhecidos como tensoativos (KOBAYASHI et al., 2002; SCHRÖEDER e SCHUBERT, 1999).

Existem diferentes tipos de tensoativos que podem ser aniônicos, catiônicos e não iônicos. Os tensoativos não iônicos não produzem íons em solução aquosa e por esta razão são compatíveis com qualquer outro tipo, e por isso são excelentes candidatos para formulações complexas que muitas vezes tem aplicações práticas (KOBAYASHI et al., 2002).

Os tensoativos desempenham duas funções importantes na formação da nanoemulsão, pois reduz a tensão superficial entre o óleo e a água facilitando a distribuição das gotículas e estabiliza as gotículas contra a coalescência e/ou agregação (KOBAYASHI et al., 2002).

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

#### **2.5.1.1.6 Equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL)**

O tensoativo deve ser equilibrado em termos de ter a quantidade certa de grupos solúveis em água e solúveis em óleo que se concentram na interface e, portanto, diminuem a tensão superficial. Por conseguinte, o tensoativo deve conter uma parte hidrofílica e outra lipofílica de forma equilibrada, de modo que quando inicialmente disperso na fase oleosa ou na fase aquosa, migre para a interface e se oriente com o grupo hidrofílico na água e o grupo lipofílico na fase oleosa. Griffin (1949) desenvolveu uma escala arbitrária de valores que servem como uma medida de equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL) dos agentes superficialmente ativos. Assim, através deste sistema numérico de índice EHL pode-se definir um intervalo de máxima eficiência para cada espécie ou classe de tensoativos. Nessa escala, quanto maior o EHL de um agente mais hidrofílico ele será.

A Tabela 4 apresenta a classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL conforme descrito por Griffin (1949).

**Tabela 4:** Classificação dos agentes emulsificantes de acordo com seu EHL.

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

Fonte: GRIFFIN, 1949.

## 2.6 Nanociência e Nanotecnologia e Nanobiotecnologia

A palavra “nano” tem origem no grego antigo e significa “*anão*”, quando usada como um prefixo, a mesma indica a bilionésima parte de uma unidade. Este prefixo também é utilizado para classificar uma nova classe de materiais ou dispositivos que, na sua composição, inclua estruturas com pelo menos uma das suas dimensões menores que 100nm, os quais recebem o nome de nonomaterias (ALBANESE et al., 2012; QIAO et al., 2009). Richard P. Feynman foi um dos idealizadores desta nova área de conhecimento. Mesmo antes de serem desenvolvidos instrumentos para caracterização e manipulação de átomos individualmente, ele já havia levantado questões sobre a construção de novos materiais a partir da manipulação direta átomo a átomo (BAJAJ et al., 2010; HORNYAK et al., 2008).

A nanociência consiste no estudo de fenômenos e da manipulação em nível atômico, molecular e macromolecular de materiais. Esses, na escala nano, apresentam propriedades diferentes das apresentadas quando em dimensão macroscópica. O termo nanotecnologia se refere ao uso dos conceitos desenvolvidos pela nanociência para manipular a matéria átomo por átomo e criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades novas e únicas. A nanotecnologia aplicada às ciências da vida recebe o nome de nanobiotecnologia e seu objetivo é a criação de novas drogas e metodologias para liberação em alvos específicos, desenvolvimento de protocolos para fabricação de complexos para serem empregados em tratamentos e diagnósticos de diversas patologias (MACHADO, 2014).

Os nanomateriais apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies

macroscópicas, sendo essas propriedades úteis em aplicações tecnológicas, formando a base da nanotecnologia de materiais (QUINA, 2004).

Segundo Pina et al. (2006) dentre as possíveis aplicações dos nanomateriais podem ser citadas:

- Indústria automobilística e aeronáutica: materiais mais leves, pneus mais duráveis, plásticos não inflamáveis e mais baratos;
- Indústria eletrônica e de comunicações: armazenamento de dados, telas planas, aumento na velocidade de processamento;
- Indústria química e de materiais: catalisadores mais eficientes, ferramentas de corte mais duras, fluidos magnéticos inteligentes;
- Indústria farmacêutica, biotecnológica e biomédica: novos medicamentos baseados em nanoestruturas, kits de autodiagnóstico, materiais para regeneração de ossos e tecidos;
- Setor de fabricação: novos microscópios e instrumentos de medida, ferramentas para manipular a matéria a nível atômico, bioestruturas;
- Setor energético: novos tipos de bateria, fotossíntese artificial, economia de energia ao utilizar materiais mais leves e circuitos menores;
- Meio-ambiente: membranas seletivas, para remover contaminantes ou sal da água, novas possibilidades de reciclagem.

Os nanomateriais podem ser distinguidos como estando organizados em várias dimensões, como: 0D, 1D, 2D e 3D. Os nanomateriais 0D são os que possuem comprimento igual à largura, tendo como exemplo as nanopartículas e os nanocristais, podendo os mesmos ser produzidos com formas geométricas muito distintas e surpreendentes. Um exemplo de nanocristais são os pontos quânticos (*quantum dots* em inglês), que possuem um tamanho entre 1-30 nm e são constituídos por compostos semicondutores; eles apresentam propriedades óticas e elétricas altamente controláveis, tendo aplicações importantes como em sensores, marcadores biológicos e lasers (MARQUES, 2014).

Dentre os nanomateriais 1D, ou seja, nanomateriais com comprimento maior que a largura, podem ser citados os nanotubos, os nanofios e as nanofibras. Uma das propriedades dos nanotubos de carbono é ser um dos materiais mais duros e resistentes conhecidos até ao momento. Como nanomateriais 2D podem ser citados como exemplo os dendrímeros, esses são macromoléculas ramificadas, com elevada simetria e com importantes aplicações, entre elas como agentes de imagem, sensores e transportadores de fármacos. Outro nanomaterial 2D é o grafeno, ele consiste numa folha de carbono com a espessura de uma camada de

átomos se encontram num arranjo covalente hexagonal. O grafeno tem despertado um enorme interesse científico por apresentar propriedades diferenciadas como ser 100 vezes mais resistente que o aço e possuir condutividades térmica e elétrica muito elevadas (MARQUES, 2014).

Como nanomateriais 3D, encontramos os materiais coloidais auto-organizados, resultantes da agregação (não covalente) de moléculas anfifílicas tais como os tensoativos, lipídios e os copolímeros de bloco. Incluem-se nessa categoria as micelas, os lipossomas, as estruturas em bicamadas, nanotubos e cristais líquidos liotrópicos. A utilização destas estruturas como nanotransportadores de fármacos e material genético para o interior das células constitui um dos grandes temas atuais de investigação na química e física aplicada, biofísica e na biomedicina (MARQUES, 2014).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Instrumentação

Os instrumentos utilizados no desenvolvimento desse trabalho foram:

- Balança eletrônica de precisão da marca Shimadzu, modelo AY220;
- Balança eletrônica portátil da marca Ohaus, modelo CS2000 Compact Scale, com visor de cristal líquido, carga máxima de 2000 g, sensibilidade de 1 g, reprodutibilidade 1g, campo de tara: a capacidade mediante subtração, tempo de estabilização  $\leq 3$  s;
- Centrifuga microprocessada para tubos da marca Quimis, modelo Q222TM;
- Cromatógrafo a gás Agilent Modelo 7890A equipado com uma coluna capilar HP-5MS de 30 m, 0,250 mm D.I. e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ;
- Destilador de água tipo Pilsen da marca Quimis, modelo Q341;
- Detector seletivo de massa Agilent Modelo 5975C;
- Equipamento de RMN da Bruker (EUA) modelo Ascend 600;
- Equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern);
- Espectrômetro micro-Raman, modelo LabRam HR 800, da marca Horiba Inc;
- Estufa microprocessada de secagem da marca Quimis, modelo Q317M, com temperatura e tempo controlado, com duas bandejas de tela de aço inoxidável;
- Hidrodestilador: aparelho tipo Clevenger modificado, junto com um balão de fundo redondo de 5.000 mL, uma manta aquecedora e um bebedouro modificado para refrigeração;
- Liquidificador da marca Mondial, modelo Power 2i, com duas velocidades, função pulsar e copo em PP inquebrável;
- Peagâmetro da marca Quimis, modelo Q400MT;
- Picnômetro de 10 ml;
- Refratômetro de bancada Abbé da marca Nova Instruments, modelo NOVA WYA-2S;
- Sonificador da marca Sonoplus Bandelin UW 2070.



## 3.2 Reagentes e soluções

Os reagentes e as soluções utilizados nesse trabalho foram:

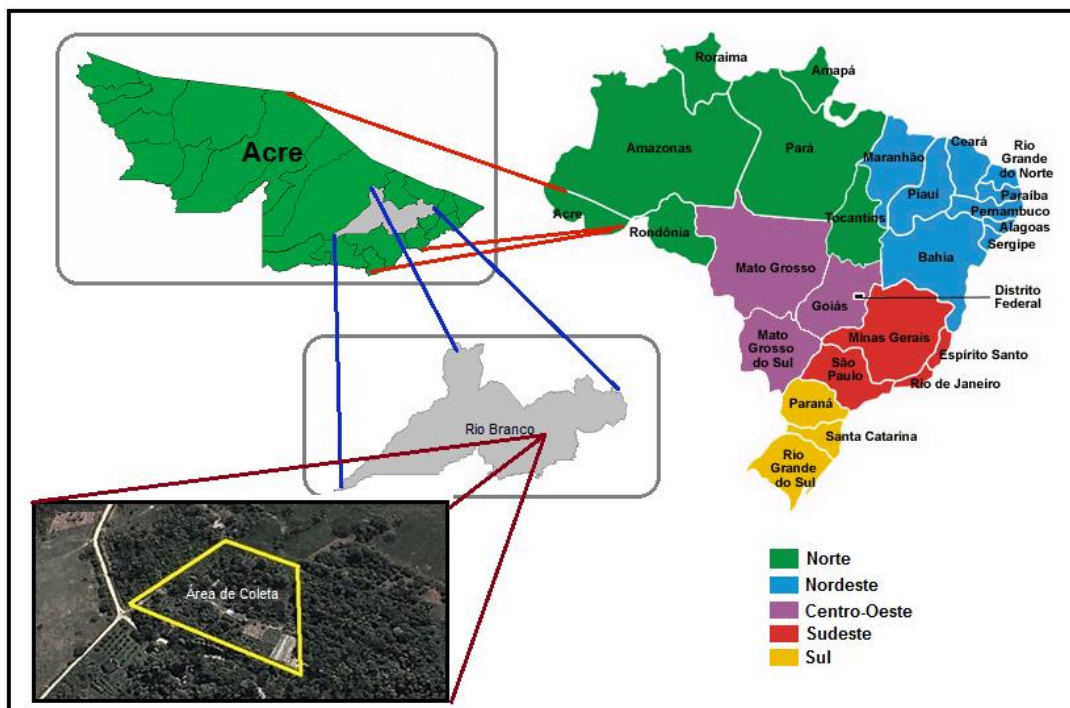
- Água destilada;
- Água purificada;
- Álcool etílico;
- Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio (MTT);
- Clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>);
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Eritrosina B;
- Éter etílico;
- Oleato de Sobitano 80 - Span® 80;
- Óleo essencial de *Lantana camara* Linn (OELCL);
- Polissorbato 80 - Tween® 80;
- Solução alcoólica de fenolftaleína;
- Solução de hidróxido de sódio a 0,1 N;
- Solução RPMI 1640;
- Soro fetal bovino;
- Tetrametilsilano (TMS).

## 3.3 Metodologia

### 3.3.1 Coletas das folhas

As folhas da espécie *Lantana camara* Linn foram coletadas de plantas adultas variando de 1 m a 2 m de altura em uma propriedade particular localizada na rodovia AC 040 km 11, Ramal Santa Maria, na cidade de Rio Branco, no estado do Acre, Latitude 10° 04' 12,65" S e Longitude 67° 45' 48,52" O (Figura 12). A coleta das folhas foi realizada em

meses chuvosos, sendo feita entre os meses de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 e entre novembro de 2014 a janeiro de 2015. Foi realizado um registro da espécie *Lantana camara* Linn (exsicata) no laboratório de Botânica da UFAC, com número do tomo 6570.



**Figura 12.** Área de coleta das folhas de *Lantana camara* Linn.  
Imagem: Antonio O. da Costa.

### 3.3.2 Seleção do material botânico

As folhas de *Lantana camara* Linn foram selecionadas e lavadas, retirando as partes danificadas e a poeira, sendo colocadas em seguida na estufa à temperatura de 45 °C até a secagem uniforme.

### 3.3.3 Cálculo do rendimento (%) do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

Segundo Santos et al. (2004), o rendimento do óleo essencial extraído pode ser calculado com base na matéria seca ou base livre de umidade (BLU) e na matéria úmida ou

base úmida (BU), onde o método que utiliza a matéria seca é um método padronizado, podendo ser repetido a qualquer momento, já o método BU é impreciso, não apresenta repetibilidade e induz a grandes desvios em virtude de não ser levado em conta à verdadeira quantidade de biomassa seca utilizada.

No cálculo do rendimento da extração de óleo essencial utilizando o método BLU, temos a seguinte equação (2):

$$TO = \frac{V_o}{B_m - \left(\frac{B_m \times U}{100}\right)} \times 100 \quad (2)$$

onde,

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

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

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

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

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

100 = fator de conversão para porcentagem.

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

### 3.3.4 Extração do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

As folhas secas de *Lantana camara* Linn finamente trituradas foram hidrodestilada durante 2 horas com o uso de aparelho tipo Clevenger modificado, instalado no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC. Utilizaram-se para cada extração 2,5 litros de água destilada e 300 g de folhas secas trituradas colocadas em balão de fundo redondo de 5.000 mL. No final da extração foi feita a aferição do volume do OE no mesmo

aparelho clevenger, para em seguida ser armazenado em vidro âmbar com tampa e colocado em refrigerador à temperatura inferior a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **3.3.5 Caracterização físico-química do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn**

#### **3.3.5.1 Índice de Refração**

O índice de refração do OELCL foi determinado com a utilização de um refratômetro de bancada Abbé. Para a realização da medida do índice de refração o aparelho foi ajustado com água destilada. Após o ajuste, foram colocadas três gotas da amostra entre os prismas, realizando-se a leitura na escala, obtendo-se o índice de refração absoluto.

#### **3.3.5.2 Medida da Densidade**

A densidade do OELCL foi determinada pelo método de deslocamento de fluidos em picnômetro à temperatura ambiente de  $25^{\circ}\text{C}$ . Os picnômetros foram previamente calibrados com água destilada e os dados coletados em triplicata (MOURA et al., 2001).

#### **3.3.5.3 Medida do Índice de Acidez**

O Índice de Acidez foi medido seguindo a metodologia descrita por Vasconcelos e Godinho (2002) onde se pesou cerca de 2 g do óleo em um erlemeyer de 125 mL e em seguida foi adicionado 25 mL da mistura éter etílico: álcool etílico na proporção (2:1) acompanhado de agitação. Adicionou-se a seguir 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína e titulou-se com solução 0,1 N de hidróxido de sódio até que a solução passasse de incolor para uma coloração rósea.

O índice de acidez é calculado pela equação (3):

$$IA = \frac{V.N.56,1}{m} \quad (3)$$

em que IA é o índice de acidez expresso em mgKOH/g, V é o volume de solução de NaOH gasto na titulação em mililitros, N é a normalidade da solução, f é o fator de correção e m é a massa da amostra em gramas.

#### **3.3.5.4 Medida do pH**

Para medida do pH do OELCL foi utilizado o peagâmetro previamente calibrado com soluções tampões padrões e o pH foi medido inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra. A medida foi realizado em triplicata.

#### **3.3.5.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

A análise cromatográfica gasosa (CG) foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent Modelo 7890A equipado com uma coluna capilar HP-5MS de 30 m, 0,250 mm D.I. e filme 0,25 µm. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C durante 2 min, em seguida foi elevada a 180 °C a uma taxa de 4 ° C/min, sendo novamente elevada a 250 °C a uma taxa de 10 ° C/min. Utilizou-se hélio como gás transportador, velocidade de fluxo 0,8 ml.min<sup>-1</sup> e modo de divisão. A composição percentual de cada componente foi calculada pela integração das áreas dos picos do cromatograma.

A análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent Modelo 7890A em interface com um detector seletivo de massa Agilent Modelo 5975C (Figura 13). Utilizou-se hélio como gás transportador. As condições operacionais do detector foram: tensão de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de íons de 230 °C. Os espectros de massas foram gravados a partir de 40 - 550 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus

espectros de massa onde o espectro obtido é comparado em biblioteca fornecida com o equipamento (Mass Spectral Libraries Rev D.05.00) e mantida atualizada pelo Departamento da Polícia Federal. O CG foi equipado com uma coluna capilar HP-5MS de 30 m, 0,250 mm D.I. e filme 0,25  $\mu\text{m}$ . Os parâmetros operacionais do CG foram os mesmos descritos acima.

As medidas acima citadas foram realizadas no Laboratório do Departamento de Polícia Federal do Acre.



**Figura 13.** Cromatógrafo a gás em interface com um detector seletivo de massa.

### 3.3.5.6 Análises espectroscópicas do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

#### 3.3.5.6.1 Espectroscopia Raman

A medida dos espectros no Raman foi realizada no Laboratório da Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT, para isso utilizou-se de um espectrômetro micro-Raman, modelo LabRam HR 800, da marca Horiba Inc., com faixa de resposta entre 80 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ , com laser He-Ne operando com comprimento de onda de 633 nm, microscópio com lente de

ampliação de 10X, pinhole de 100 mm. O tempo de integração para a medida foi de 5s, a potência estimada de 10 mW e o número de acumulações de 5 vezes. Após passar pelas grades de refração o sinal Raman advindo da amostra foi coletado por meio de CCD tipo Peltier, operando à temperatura de -70°C.

### 3.3.5.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foi realizada em equipamento de RMN da Bruker (EUA) modelo Ascend 600, equipado com sonda de 5 mm e operando a 600 MHz, do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade de Brasília - UnB. Os espectros foram adquiridos a 25 °C na frequência de 600 MHz, tendo como solvente  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

### 3.3.6 Desenvolvimento das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos - UFAC, utilizando-se o método de sonicação por alta energia (ABBAS *et al.*, 2013). Como fase aquosa usou-se água destilada, como fase oleosa utilizou-se OELCL, e como tensoativo foram usados Polissorbato 80 e Oleato de Sorbitano 80 com especificações apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5:** Características dos tensoativos utilizados nas formulações

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

Primeiro foi realizada uma pré-emulsão dissolvendo-se o tensoativo na fase aquosa para depois ser misturado na fase oleosa. A solução foi colocada dentro do equipamento sonificador. Manteve-se contato direto da ponta do aparelho com a solução, e foi utilizada

uma potência de 60 watts para 5 ciclos de processamento de 5 minutos, refrigerando o sistema com um banho de gelo para reduzir o aquecimento e desta forma evitar alterações nos resultados (SOLANS, 2005).

### 3.3.6.1 Determinação do EHL requerido do óleo essencial de *Lantana camara* Linn.

Para o estudo do EHL do óleo, utilizou-se um tensoativo hidrofílico e outro lipofílico. A determinação do EHL requerido do OELCL foi realizada a partir de valores de EHL de 8,0 até 15,0 (Tabela 4). Para o cálculo das quantidades dos tensoativos hidrofílico e lipofílico necessárias para o preparo das emulsões em cada valor de EHL foi empregado o método citado por Griffin (1949) utilizando-se do sistema de equações abaixo:

$$\frac{M_A \cdot EHL_A + M_B \cdot EHL_B}{M_A + M_B} = EHL_{Final} \quad (4)$$

$$M_A + M_B = 10 \text{ g} \quad (5)$$

Em que:

$M_A$  = massa de tensoativo hidrofílico;

$M_B$  = massa de tensoativo lipofílico;

$EHL_A$  = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

$EHL_B$  = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

$EHL_{Final}$  = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Final.

As formulações dos tensoativos com diferentes valores de EHL foram preparadas com massa total de 10,0 g visando sua utilização para diversas amostras. Os valores das massas para as formulações dos tensoativos com EHL variando de 8,0 a 15,0 e massa total de 10,0 g estão na Tabela 6.



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

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

As quantidades totais dos componentes da emulsão - água, óleo e tensoativos, utilizadas nas formulações, estão descritas na Tabela 7 e na Tabela 8.

**Tabela 7:** Composição das formulações para estudo do EHL – 5% de tensoativos.

<b>Formulação</b>	<b>EHL</b>	<b>Água (%)</b>	<b>Massa da água (g)</b>	<b>Tensoativo (%)</b>	<b>Massa do tensoativo (g)</b>	<b>Óleo (%)</b>	<b>Massa do Óleo (g)</b>	<b>Massa Total (g)</b>
F-1A	8,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-2A	9,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-3A	10,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-4A	11,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-5A	12,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-6A	13,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-7A	14,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0
F-8A	15,0	90	4,5	5	0,25	5	0,25	5,0

**Tabela 8:** Composição das formulações para estudo do EHL – 10% de tensoativos.

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

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

### 3.3.6.2. Teste de centrifugação

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

### 3.3.6.3 Diagrama Ternário

O diagrama ternário é um método útil quando se estuda a variação de três grandezas. No estudo da formulação da nanoemulsão onde há variações da quantidade de água, óleo e tensoativo é útil considerar o uso de um diagrama ternário (de fase) para selecionar a relação adequada dos mesmos. Este procedimento proporciona um meio sistemático para aperfeiçoar a formulação de uma emulsão. No método descrito por Treguier *et al.* (1975), o diagrama ternário é representado no plano como um triângulo equilátero, onde os três constituintes são simétricos. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos constituintes: óleo, tensoativos e água. O vértice superior representa 100% de tensoativos, o inferior direito, 100% de fase oleosa e o inferior esquerdo, 100% de fase aquosa. Para determinar as concentrações de cada constituinte no ponto M, deve-se traçar sucessivamente por este ponto as paralelas aos lados opostos aos vértices 100% de cada constituinte (Figura 9).

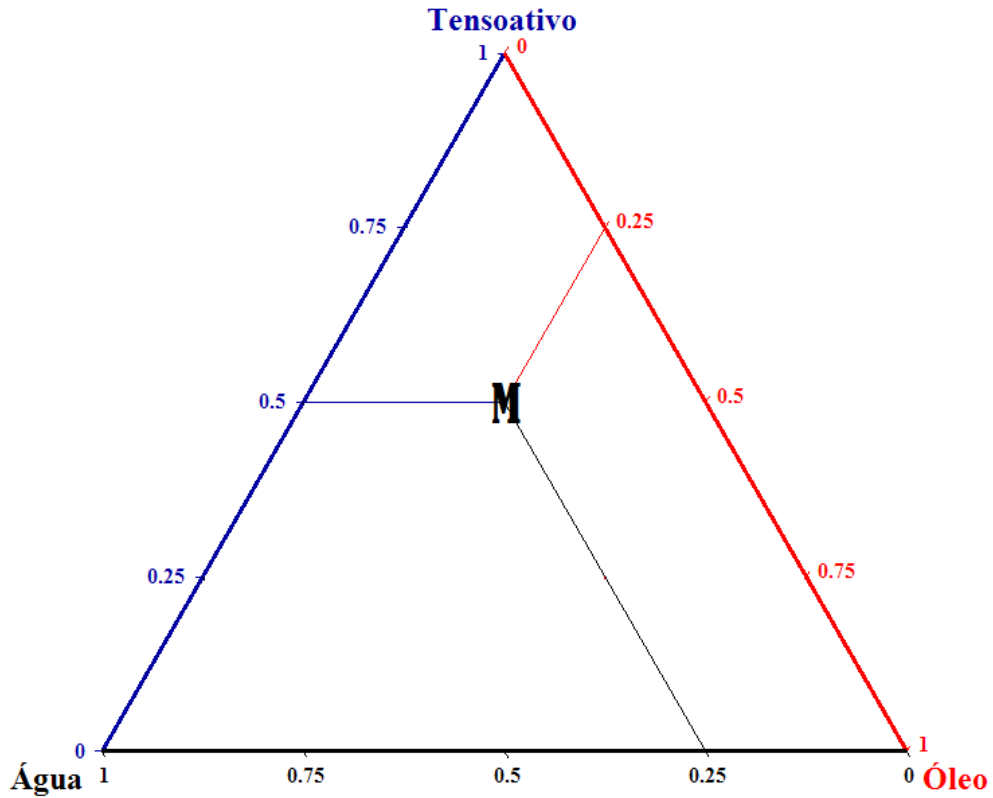


Figura 14: Representação do Diagrama Ternário.

Foi construído o diagrama ternário com 9 formulações para o tensoativo (ou par de tensoativos) que no procedimento de determinação do EHL requerido para o OELCL obteve emulsão transparente, sendo este um indicativo de uma nanoemulsão (Figura 10).

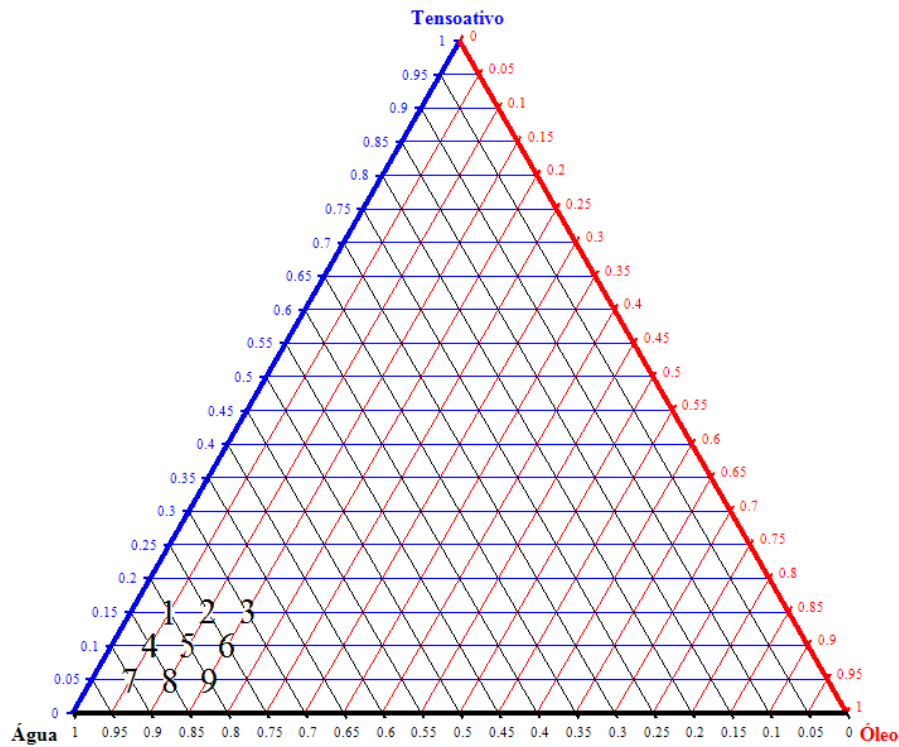


Figura 15: Diagrama ternário: OELCL, tensoativo e água.

As quantidades de cada componente do diagrama para as respectivas formulações encontram-se descritas na Tabela 9.

**Tabela 9:** Quantidade de água, tensoativos e óleo das formulações contidas no diagrama ternário.

Formulação	Água (%)	Massa de água (g)	Tensoativo (%)	Massa de tensoativo (g)	Óleo (%)	Massa de Óleo (g)	Massa Total (g)
F-1C	80	4,00	15	0,75	5	0,25	5,00
F-2C	75	3,75	15	0,75	10	0,50	5,00
F-3C	70	3,50	15	0,75	15	0,75	5,00
F-4C	85	4,25	10	0,50	5	0,25	5,00
F-5C	80	4,00	10	0,50	10	0,50	5,00
F-6C	75	3,75	10	0,50	15	0,75	5,00
F-7C	90	4,50	5	0,25	5	0,25	5,00
F-8C	85	4,25	5	0,25	10	0,50	5,00
F-9C	75	3,75	5	0,25	15	0,75	5,00

#### 3.3.6.4 Caracterização das nanoemulsões

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

#### 3.3.7 Teste da atividade anti-leishmania

O OELCL e as nanoemulsões formuladas a partir OELCL foram utilizados para avaliar a atividade anti-leishmania. A avaliação foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde – Fiocruz Rondônia. Foram usadas formas promastigotas de *Leishmania*

*amazonensis* (IFLA/BR/67PH8) obtida de camundongos BALB/c previamente inoculados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em uma das patas traseiras. As culturas de promastigotas contendo  $5 \times 10^5$  parasitas por mL foram, incubadas a 24°C em estufa B.O.D. e os parasitas foram contados a cada cinco dias. O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* foi o RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Utilizou-se um número de  $5 \times 10^5$  por mL de promastigotas de *L. amazonensis* em início de fase estacionária que foram incubadas com o OELCL e as nanoemulsões nas concentrações de 50 µL em um volume final de 500 µL por poço.

Após 48 horas uma alíquota de 10µL foi diluída no corante eritrosina B a 0,04% (p/v), para a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer (em microscópio óptico com aumento de 400X). O número de promastigotas contados era multiplicado pelo inverso da diluição e pelo fator de correção da câmara ( $10^4$ ) para se obter o número de parasitas por mL. Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de variância ANOVA e ao Teste de Tukey.

### 3.3.8 Teste da citotoxicidade frente aos macrófagos

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

Os macrófagos da linha J774 foram plaqueados a  $2,5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços e foram mantidos durante 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a aderência dos macrófagos. Após a aderência dos macrófagos foi adicionado 20µL de OELCL (grupo tratado com OELCL) bem como 20µL das formulações das nanoemulsões (grupos

tratado com nanoemulsões); em ambos os casos a concentração foi 2% por poço e os poços contendo apenas os macrófagos em meio de cultura foram utilizados como controle, sendo a placa levada para estufa de incubação nas mesmas condições anteriormente citada. Após incubação por 24 horas adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de MTT na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em cada poço e levou-se novamente para incubação por 4 horas. Decorrido o tempo foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de (dimetilsulfóxido) DMSO. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os cálculos foram determinados utilizando-se fórmula (6):

$$C\% = \left( 1 - \frac{DO_{Amostra}}{DO_{Controle}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde, C% é a citotoxicidade em porcentagem, D.O. amostra é a densidade ótica da amostra e D.O. controle é a densidade ótica do controle.

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas (ANOVA e Teste de Tukey) e expressos em porcentagem de citotoxicidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

O rendimento médio do OE de LCL extraído por hidrodestilação foi de 0,25% (Tabela 10). Esse valor representa que para 100 gramas de folhas secas de LCL serão obtidos 0,25 mL de OE por meio de hidrodestilação.

**Tabela 10:** Rendimento do OELCL.

Extração	Massa (g)	Volume (mL)	Rendimento (% ou mL/100g)
1	300	0,60	0,20
2	300	0,58	0,19
3	300	0,65	0,22
4	300	0,45	0,15
5	300	0,60	0,20
6	300	0,55	0,18
7	300	0,72	0,24
8	300	0,60	0,20
9	300	0,85	0,28
10	300	0,65	0,22
11	300	0,78	0,26
12	300	0,65	0,22
13	300	0,78	0,26
14	300	0,72	0,24
15	300	0,87	0,29
16	300	0,75	0,25
17	300	0,78	0,26
18	300	0,78	0,26
19	300	0,94	0,31
20	300	0,92	0,31
21	300	0,98	0,33
22	300	0,85	0,28
23	300	0,63	0,21
24	300	0,73	0,24
25	300	0,85	0,28
26	300	0,73	0,24
27	300	0,80	0,27
28	300	0,78	0,26
29	300	0,79	0,26
30	300	0,8	0,27
<b>Rendimento Médio</b>			<b>0,25 ± 0,04</b>

O rendimento do OELCL encontrado neste trabalho apresentou valores similares a outros trabalhos já realizados com OELCL. Na Tabela 11 encontram-se os valores do rendimento do OELCL calculado a partir da biomassa seca reportados em outros trabalhos.

**Tabela 11:** Rendimento do OELCL reportado na literatura.

Rendimento (%)	Referência
0,22	ALITONOU et al., 2004
0,23	DEENA e THOPPIL, 2000
0,20	GHISALBERTI, 2000
0,19	JAWONISI e ADOGA, 2013
0,33	MACHADO et al., 2012
0,25	SAIKIA e SAHOO, 2011
0,10 - 0,20	SILVA et al., 1999
0,20	SONIBARE e EFFIONG, 2008
0,18	SOUSA et al., 2012

A partir da análise da Tabela 8 e 9 é possível perceber que os valores encontrados nesta pesquisa e nos demais trabalhos citados sejam próximos entre si, existe uma variação no valor do rendimento do OELCL entre os diversos autores. Essa variação pode ser explicada por vários fatores que influenciam no rendimento e na composição do óleo como a localidade da coleta das folhas, a época do ano e o horário de coleta.

## 4.2 Caracterização físico-química do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

### 4.2.1 Índice de Refração

O índice de refração medido para o OELCL foi de 1,504 a 40 °C. A refração dos óleos serve para medir as refringências de uma gordura, assim de acordo com sua natureza, os óleos podem desviar com maior ou menor intensidade os raios luminosos que os atravessam. O índice de refração também está associado ao tamanho da cadeia de hidrocarbonetos, onde, quanto maior o índice maior será a cadeia de hidrocarbonetos e maior o grau de insaturação do óleo em análise. Por se tratar de uma constante para o óleo, este índice é útil na



identificação da substância, como também na detecção da presença de impurezas (MARTINS et al., 2010).

Segundo Riazi e Roomi (2001) a partir do índice de refração é possível fazer estimativa das várias propriedades termodinâmicas e físicas dos hidrocarbonetos puros bem como misturas de petróleo. Nesta linha de pensamento, esse parâmetro do OELCL é um dado importante podendo ser utilizado para estimar propriedades ainda não estudadas.

#### 4.2.2 Medida da Densidade

Os resultados da medida da densidade em  $\text{g.mL}^{-1}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do OELCL estão resumidos na Tabela 12. Ao comparar o valor médio obtido do OELCL em relação à água ( $1,0\text{ g.mL}^{-1}$ ), nota-se que o OELCL é menos denso. Durante a hidrodestilação, esta característica já havia sido notada uma vez que se verificou uma nítida separação de fases, ficando o óleo na parte superior do tubo coletor. De acordo com Baser e Buchbauer (2010) o conhecimento do valor da densidade de um OE pode ser útil quando se quer verificar se o mesmo sofreu alguma alteração ou adulteração.

A densidade do óleo também é um fator que indicará se uma emulsão formulada com o mesmo quando no estado de desestabilização sofrerá cremação ou sedimentação. Emulsões com óleos mais densos que a água sofrem sedimentação, enquanto emulsões com óleos menos densos sofrem cremação. Para emulsões formuladas com OELCL na desestabilização da emulsão ocorre a cremação.

**Tabela 12:** Densidade do OELCL.

Amostra	Densidade ( $\text{g.mL}^{-1}$ )	Densidade Média ( $\text{g.mL}^{-1}$ )
1	0,8271	
2	0,8310	0,8284
3	0,8278	

#### 4.2.3 Medida do Índice de Acidez

O índice de acidez obtido para o OELCL foi de  $1,55\text{ mg KOH/g}$  (Tabela 13). Expresso em porcentagem do ácido oléico esse valor representa  $0,77\%$ . Segundo Reis et al. (2013) este é um bom

valor, uma vez que os óleos vegetais não podem atingir valores superiores a 1%. Estes ácidos graxos livres são elementos indesejáveis que podem causar odor e sabor indesejável (REIS et al., 2013).

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (ZENEBO et al., 2008). Assim, o valor encontrado nos diz que degradação do óleo devido à presença de ácido graxo livre tem uma pequena possibilidade de acontecer, uma vez os ácidos graxos livres aparecem em pequena porcentagem.

**Tabela 13:** Medida do índice de acidez do OELCL.

Amostra	Volume consumido na titulação (ml)	Normalidade (N)	Fator de correção	Constante	Massa da Amostra (g)	IA (mgKOH/g)
1	0,60	0,1	0,9259	56,1	2,0142	1,55
2	0,60	0,1	0,9259	56,1	2,0184	1,54
<b>IA Médio</b>						<b>1,55</b>

#### 4.2.4 Medida do pH

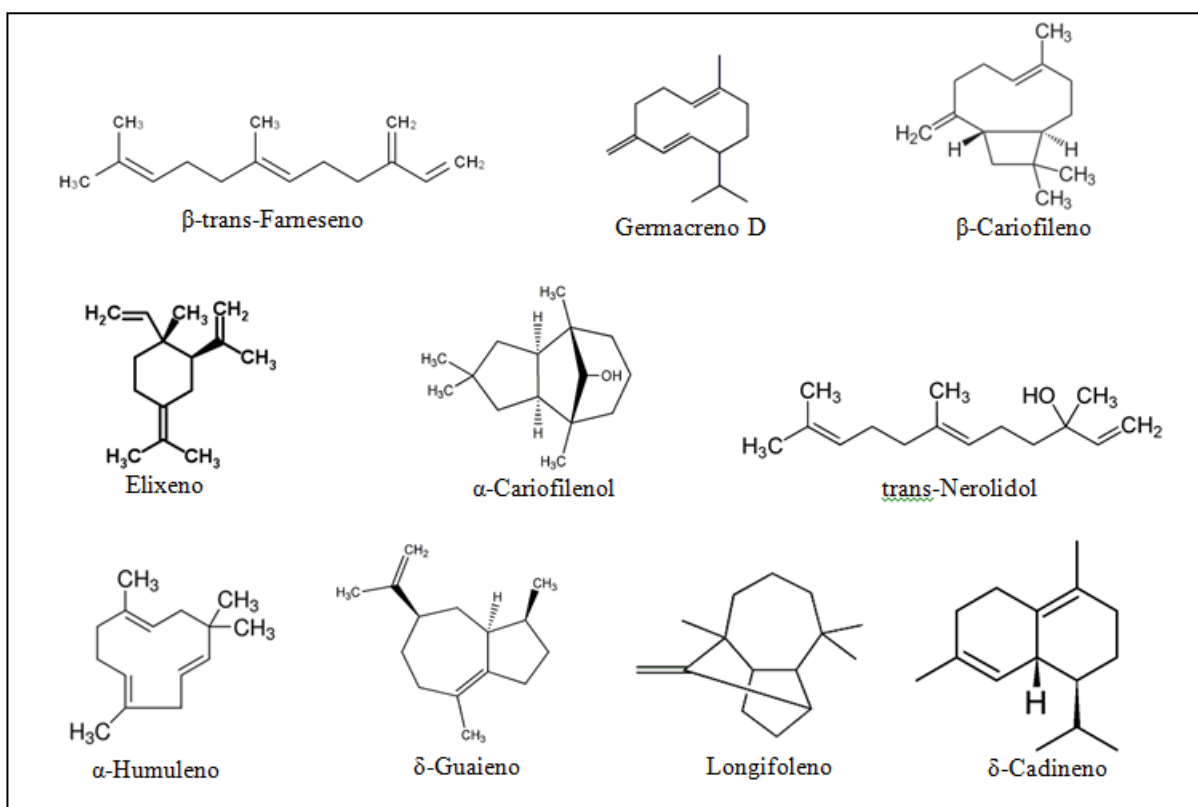
O valor médio encontrado para o pH do OELCL foi de 5,99 (Tabela 14). Esse valor indica que o óleo tem caráter ácido, e também é um indicador que o OELCL tem pH com valores desejáveis para aplicação biológicas sendo compatível com o pH da pele que varia de 4,5 a 7,0.

**Tabela 14:** Medida do pH do OELCL.

Medida	pH
1	5,87
2	6,04
3	6,07
<b>Média</b>	<b>5,99</b>

#### 4.2.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A partir da análise realizada setenta e seis constituintes foram identificados, representando 100% do OELCL. Na Tabela 15 encontram-se os compostos presentes no OELCL identificados por correspondência de seus espectros de massa, onde o espectro obtido foi comparado em biblioteca fornecida com o equipamento. Nesta tabela constam os nomes dos compostos, os tempos de retenção, a fórmula molecular, os autores que citam esses compostos como constituintes do OELCL em seus estudos, assim como a porcentagem de cada composto presente no OELCL. Os componentes majoritários foram:  $\beta$ -trans-Farneseno (29,07%), Germacreno D (24,84%),  $\beta$ -Cariofileno (10,89%), Elixeno (4,81%),  $\alpha$ -Cariofilenol (4,39%), trans-Nerolidol (4,37%),  $\alpha$ -Humuleno (3,76%),  $\delta$ -Guaieno (2,04%), Longifoleno (1,26%) e  $\delta$ -Cadineno (1,16%).



**Figura 16.** Estrutura molecular dos principais constituintes do OELCL.

Diversos compostos encontrados no OELCL relatado neste trabalho (Tabela 15) também são relatados em outros trabalhos, sendo que dezesseis compostos foram relatados em mais de oito trabalhos sobre a composição do OELCL ( $\alpha$ -Pineno,  $\alpha$ -Felandreno,  $\beta$ -Pineno,  $\gamma$ -Terpineno, Linalool, Terpinen-4-ol,  $\delta$ -Elemeno,  $\alpha$ -Cubebeno,  $\alpha$ -Copaeno,  $\beta$ -Cariofileno,  $\alpha$ -

Humuleno, Germacreno D,  $\delta$ -Cadineno, trans-Nerolidol, Espatuleno, Óxido de Cariofileno). No entanto outros vinte e nove compostos aqui relatados não são citados para a composição do OELCL na literatura disponível, evidenciando a diferença da composição do OELCL devido à localidade da coleta. Os vinte e nove compostos não relatados na literatura para a composição do OELCL são: 3-metil Butanal; cis-3-Hexenol; Hidroperóxido, hexil; 1R-alfa-Pineno; (1S)-(-)- $\beta$ -Pineno; m-Cymeno; 2-Metilbutil 2-metilbutirato; 2-Decen-1-ol; Tridecano, 3-metil-;  $\beta$ -Panasinseno; Longifoleno;  $\beta$ -cis-Cariofileno; Cypereno; (+)-epi-biciclesesquifelandreno; Elixeno; Eremofileno; Biciclo[4.4.0]-1,4-decadieno, 4,10-dimetil-7-isopropil; cis- $\alpha$ -Bisaboleno;  $\tau$ -Elemeno; Palustrol; Ledol; Epóxido de Humuleno II; Sesquiarodiol;  $\alpha$ -Cariofileno; 1-Oxaspiro[2.5]octano, 5,5-dimetil-4-(3-metil-1,3-butadienil)-; Óxido de Ledeno (II); Epóxido de Isoaromadendreno; Tetradecanal; Metil linolenato.

Conforme a Tabela 15 percebe-se que o OELCL é composto em sua maioria por sesquiterpenos, apresentando 31 compostos dessa classe ( $C_{15}H_{24}$ ), o que representa 83,04% do óleo. O OELCL ainda apresenta em sua constituição 16 compostos sesquiterpenoides (13,33%), 9 compostos monoterpenos (1,12%), 6 compostos monoterpenoides (0,30%), 1 composto diterpenoide (0,13%) e outros 12 compostos (1,59%).

**Tabela 15:** Compostos do OELCL (continua).

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Referência*	Formula	Porcentagem
1	2,933	3-Metilbutanal		$C_5H_{10}O$	0,05
2	3,639	2-etilfurano	10	$C_6H_8O$	0,08
3	7,771	2-hexenal	10	$C_6H_{10}O$	0,17
4	7,853	cis-3-Hexenol		$C_6H_{12}O$	0,03
5	8,342	Hidroperóxido, hexil		$C_6H_{14}O_2$	0,02
6	10,330	$\alpha$ -Pineno	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14	$C_{10}H_{16}$	0,02
7	10,540	1R-alfa-Pineno		$C_{10}H_{16}$	0,28
8	12,073	$\alpha$ -Felandreno	1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14	$C_{10}H_{16}$	0,12
9	12,154	$\beta$ -Pineno	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14	$C_{10}H_{16}$	0,27
10	12,393	1-Octen-3-ol	1, 6, 7, 10, 13	$C_8H_{16}O$	0,70
11	12,813	(1S)-(-)- $\beta$ -Pineno		$C_{10}H_{16}$	0,05
12	13,005	3-Octanol	8	$C_8H_{18}O$	0,17
13	14,037	m-Cymeno		$C_{10}H_{14}$	0,06
14	14,188	Limoneno	8, 10, 12, 14	$C_{10}H_{16}$	0,07
15	14,999	$\beta$ -Ocimeno		$C_{10}H_{16}$	0,18

Tabela 15: continuação.

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Referência*	Formula	Porcentagem
16	15,360	$\gamma$ -Terpineno	4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,08
17	16,951	Linalol	4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,10
18	17,132	2-Metilbutil 2-metilbutirato		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,02
19	17,569	Nonanal	6, 13	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	0,05
20	19,248	Pinocarvono	2, 13	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,09
21	19,784	Terpinen-4-ol	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,04
22	20,390	Salicilato de metila	13	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,09
23	24,062	2-Decen-1-ol		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	0,02
24	24,389	$\alpha$ -Longipineno	13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,09
25	25,356	$\delta$ -Elemeno	2, 3, 4, 6, 10, 12, 13, 14	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,24
26	25,758	$\alpha$ -Cubebeno	2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,05
27	25,997	Eugenol	4, 13	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,02
28	26,178	3-metil-tridecano		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	0,02
29	26,621	$\alpha$ -Copaeno	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,42
30	26,767	$\beta$ -Panasinseno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,04
31	26,918	$\beta$ -Bourboneno	6, 8, 13, 14	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,65
32	27,093	$\beta$ -Cubebeno	2, 9, 13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,14
33	27,157	Longifoleno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,26
34	27,361	Tetradecano	4	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	0,02
35	27,449	$\beta$ -cis-Cariofileno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,16
36	27,728	Cypereno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,94
37	28,096	$\beta$ -Cariofileno	1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	10,89
38	28,335	(+)-epi-biciclesesquifelandreno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,39
39	28,463	$\gamma$ -Elemeno	3, 4, 6, 8, 9, 11, 14	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,11
40	28,626	$\alpha$ -Guaieno	13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,88
41	28,807	$\gamma$ -Muuroleno	2, 7, 8, 12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,10
42	29,017	$\beta$ -Gurjuneno	13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,02
43	29,121	$\alpha$ -Humuleno	2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,76
44	29,337	$\beta$ -trans-Farneseno	2, 4, 9, 12, 13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	29,07
45	29,518	Alloaromadendreno	4, 6, 8, 11, 13, 14	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,10
46	30,101	Germacreno D	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	24,84
47	30,182	$\beta$ -Selineno	6, 8, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,25
48	30,328	$\gamma$ -Cadineno	1, 6, 7, 8, 11, 12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,08

Tabela 15: continuação.

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Referência*	Formula	Porcentagem
49	30,485	Elixeno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	4,82
50	30,730	δ-Guaieno	7, 10	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2,04
51	30,969	Eremofileno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,21
52	31,231	δ-Cadineno	2, 3, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,16
53	31,494	Biciclo[4.4.0]-1,4-decadieno, 4,10-dimetil-7-isopropil		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,04
54	31,645	α-Muuroleno	13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,07
55	31,773	cis-α-Bisaboleno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,07
56	31,983	Elemol	6	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,04
57	32,240	τ-Elemeno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,13
58	32,420	trans-Nerolidol	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	4,37
59	32,549	Palustrol		C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,32
60	32,840	Espatuleno	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,69
61	33,009	Óxido de Cariofileno	2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,55
62	33,260	Viridiflorol	2, 3, 4, 12, 13, 15	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,75
63	33,586	Ledol		C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,43
64	33,761	Epóxido de Humuleno II		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,22
65	34,280	Sesquivarodiol		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0,14
66	34,385	Cubenol	4, 12, 13	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,04
67	34,624	τ-Cadinol	4, 12	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,46
68	34,775	δ-Cadinol	3, 11, 12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,13
69	35,014	α-Cadinol	1, 4, 11, 12, 13	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,55
70	35,356	α-Cariofileno		C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	4,39
71	35,486	1-Oxaspiro[2.5]octano, 5,5-dimetil-4-(3-metil-1,3-butadienil)-		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	0,15
72	35,889	Óxido de Ledeno (II)		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,18
73	36,011	Epóxido de Isoaromadendreno		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,06
74	36,570	Tetradecanal		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O	0,37
75	41,840	Metil linolenato		C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0,19
76	47,569	Fitol	6, 8, 10	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	0,13

\*Referências: 1 (SONIBARE e EFFIONG, 2008); 2 (SAIKIA e SAHOO, 2011); 3 (SOUSA et al., 2012); 4 (KHAN et al., 2002); 5 (JAWONISI e ADOGA, 2013); 6 (SINGH et al., 2012); 7 (ALITONOU et al., 2004); 8 (SINGH e TIWARI, 2011); 9 (MACHADO et al., 2012); 10 (ZOUBIRI e BAALIOUAMER, 2012); 11 (COSTA et al., 2009); 12 (RANDRIANALJAONA et al., 2005); 13 (SILVA et al., 1999); 14 (MEDEIROS et al., 2012); 15 (MURUGESAN et al., 2012).

O cromatograma do OELCL é apresentado na Figura 17, onde estão contidos a abundância relativa e o tempo de retenção para cada pico.

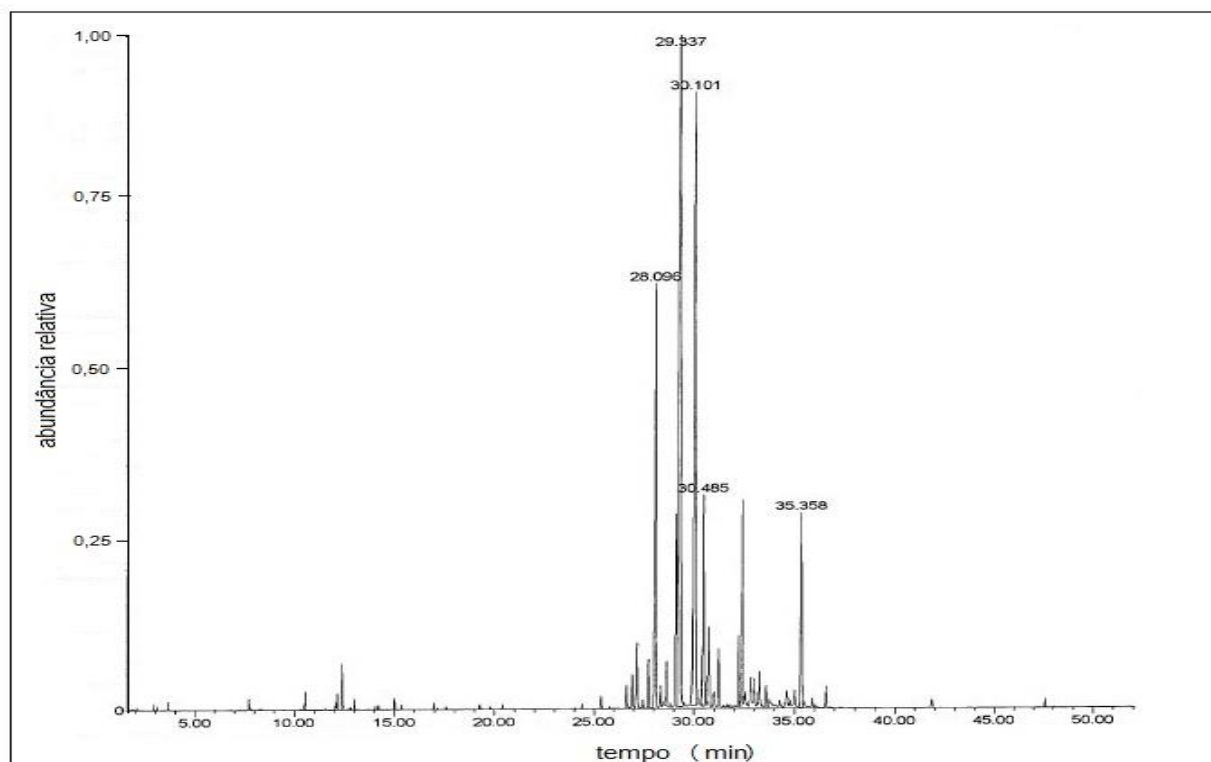


Figura 17. Cromatograma do OELCL.

Nas Figuras de 18 a 29 estão os espectros de massa obtidos dos principais componentes do OELCL estudado.

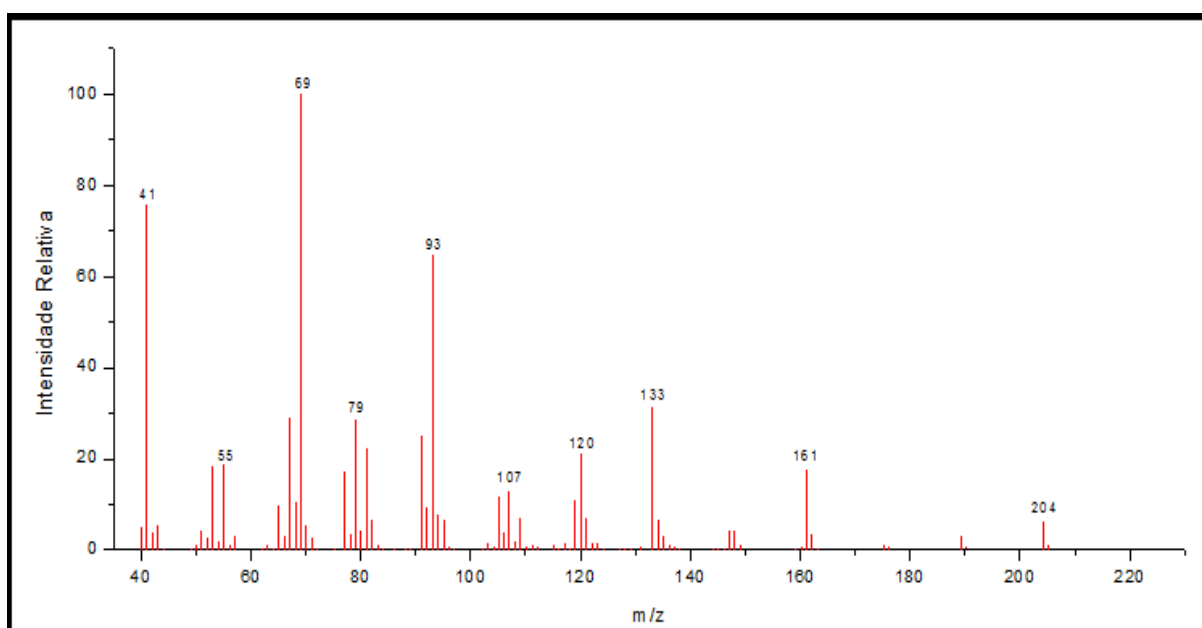
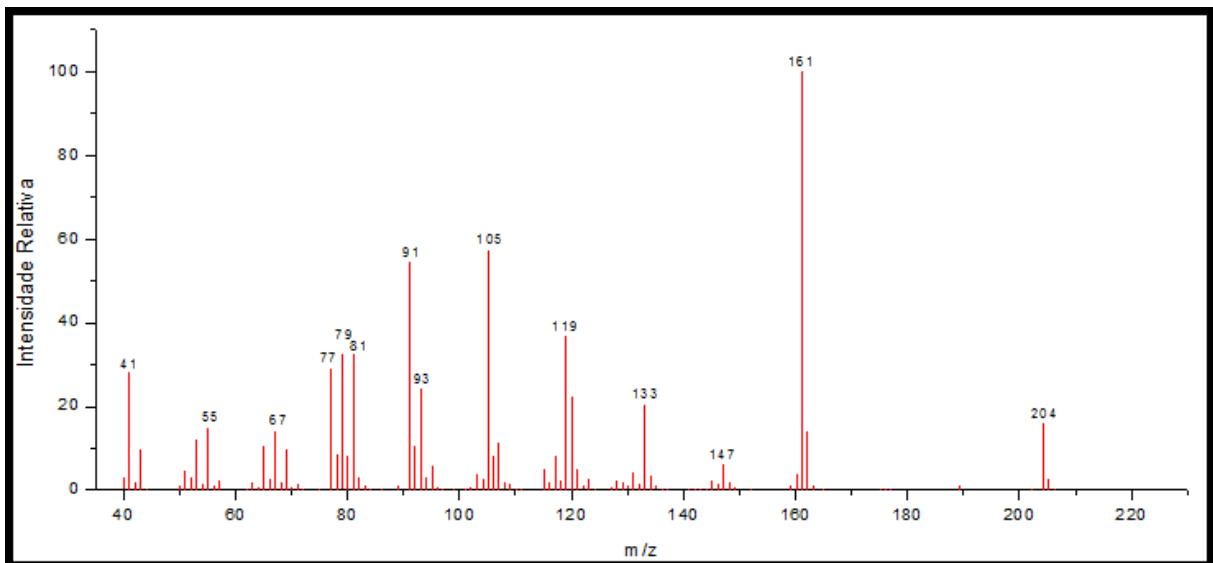
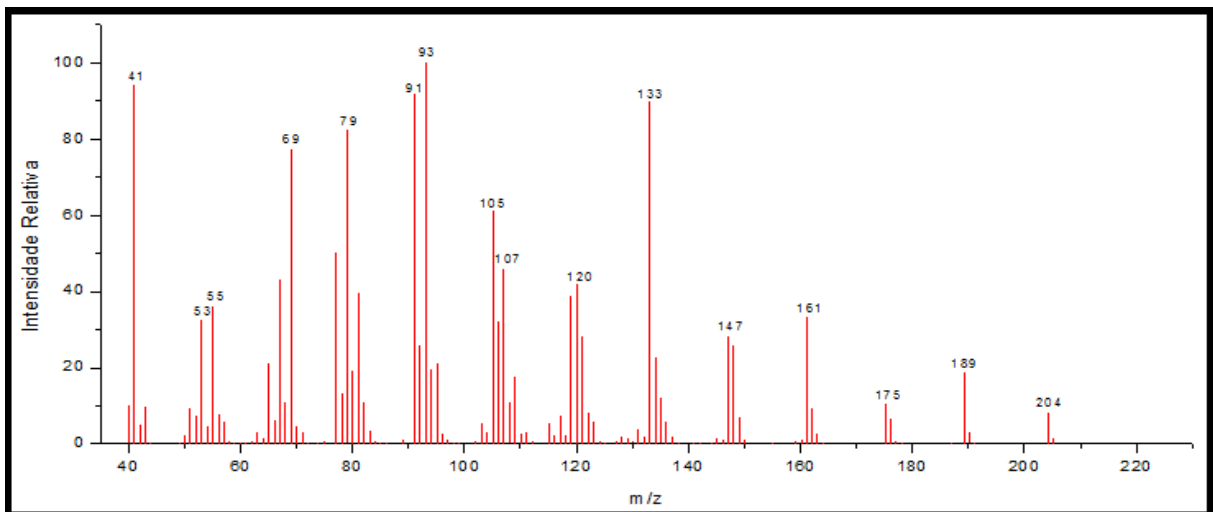


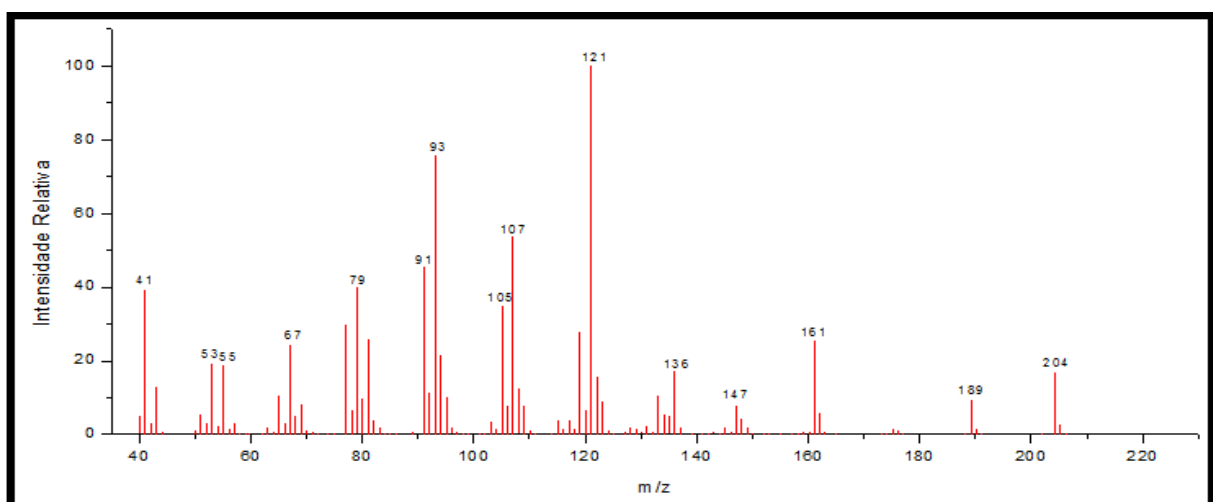
Figura 18. Espectro de massa do  $\beta$ -trans-farneseno.



**Figura 19.** Espectro de massa do Germacreno D.



**Figura 20.** Espectro de massa do  $\beta$ -cariofileno.



**Figura 21.** Espectro de massa do Elixeno.



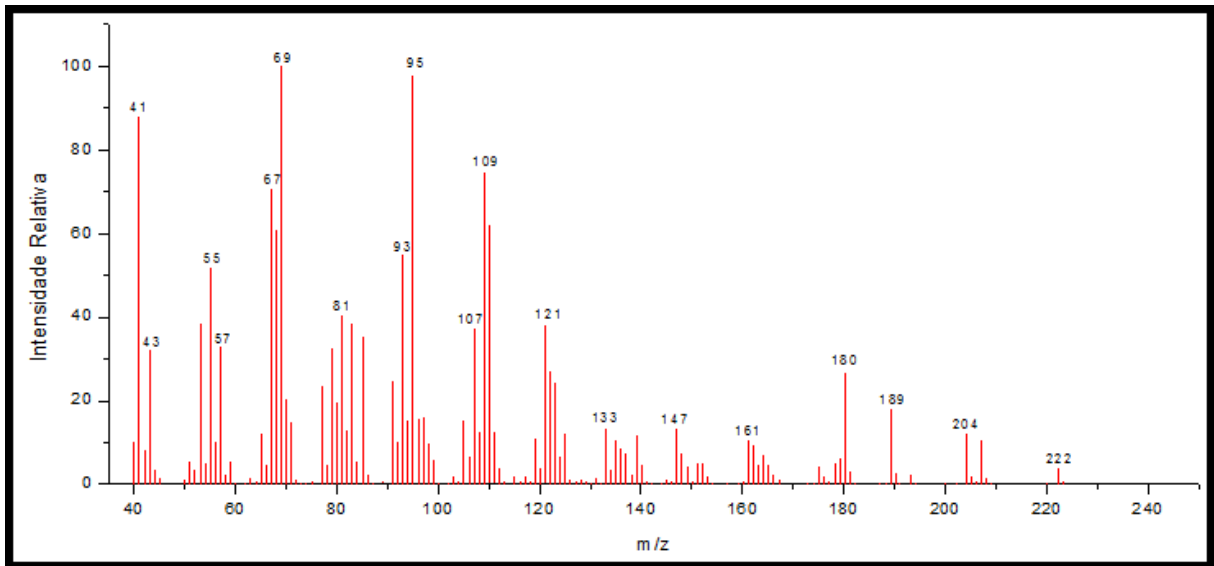


Figura 22. Espectro de massa do  $\alpha$ -cariofilenol.

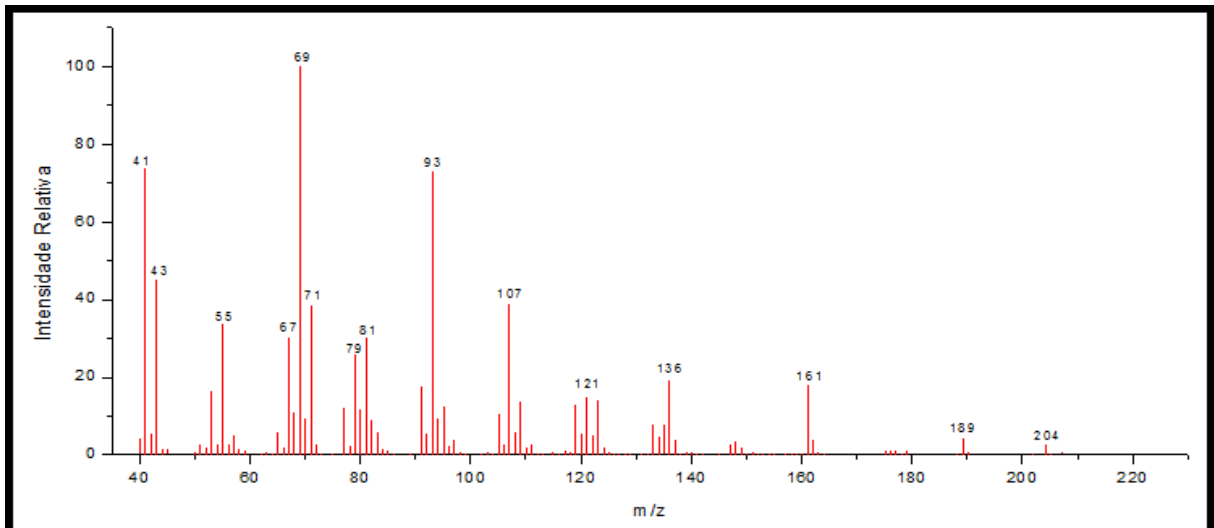


Figura 23. Espectro de massa do trans-nerolidol.

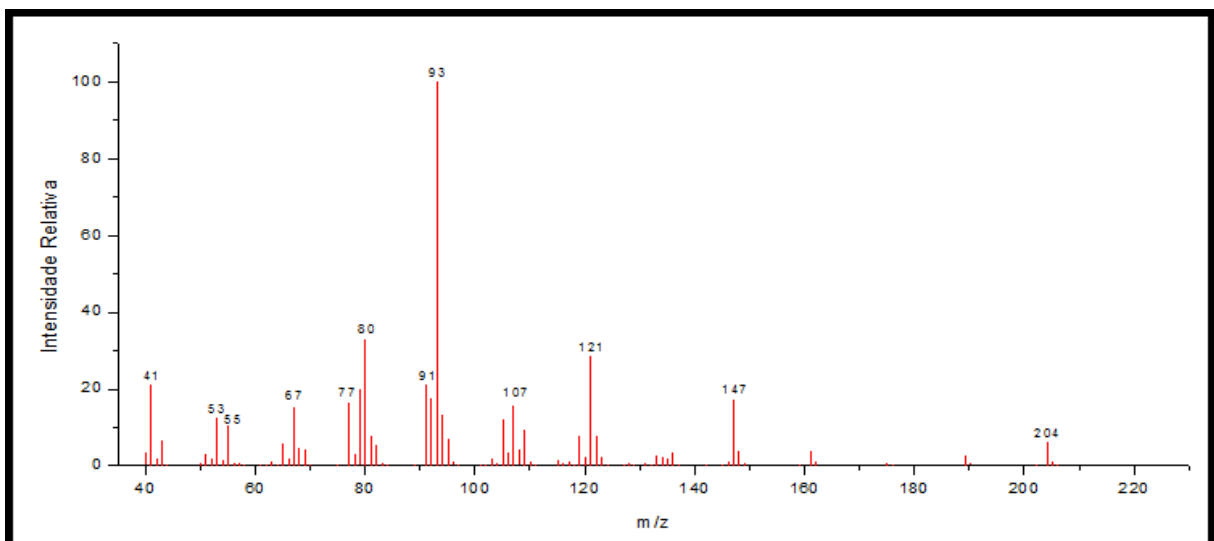


Figura 24. Espectro de massa do  $\alpha$ -humuleno.

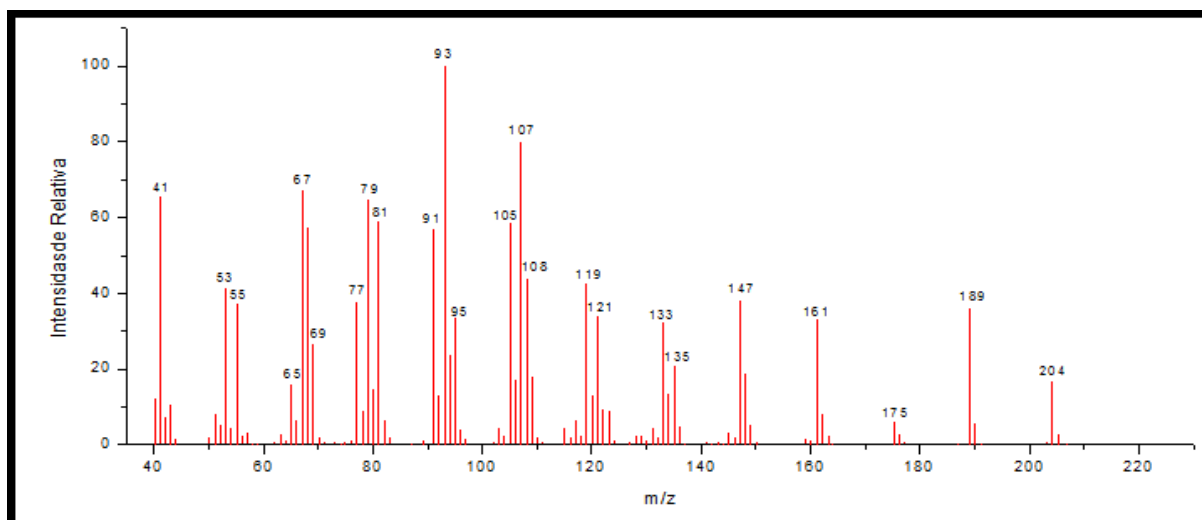


Figura 25. Espectro de massa do  $\delta$ -guaieno.

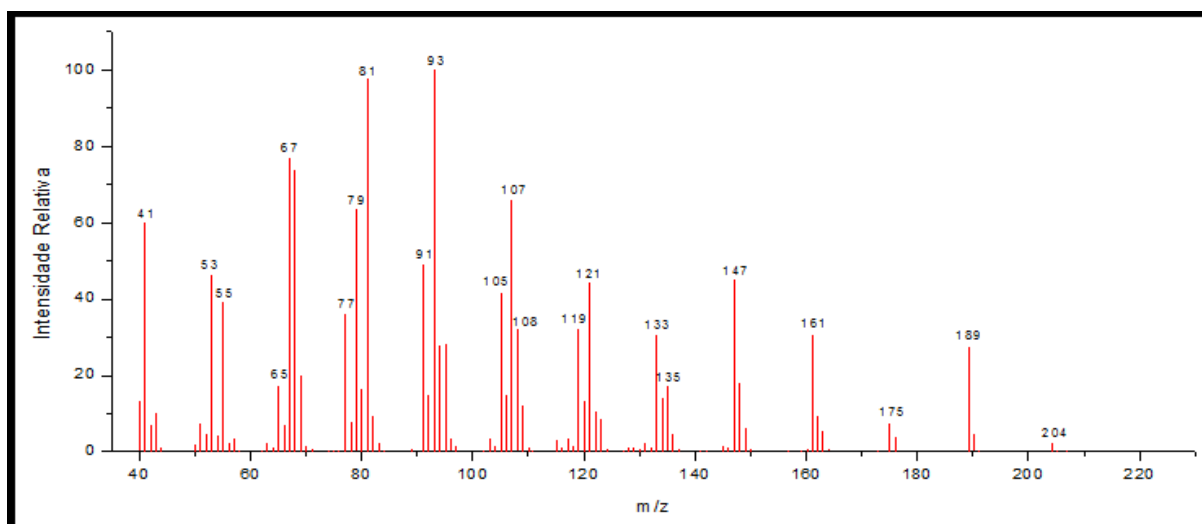


Figura 26. Espectro de massa do longifoleno.

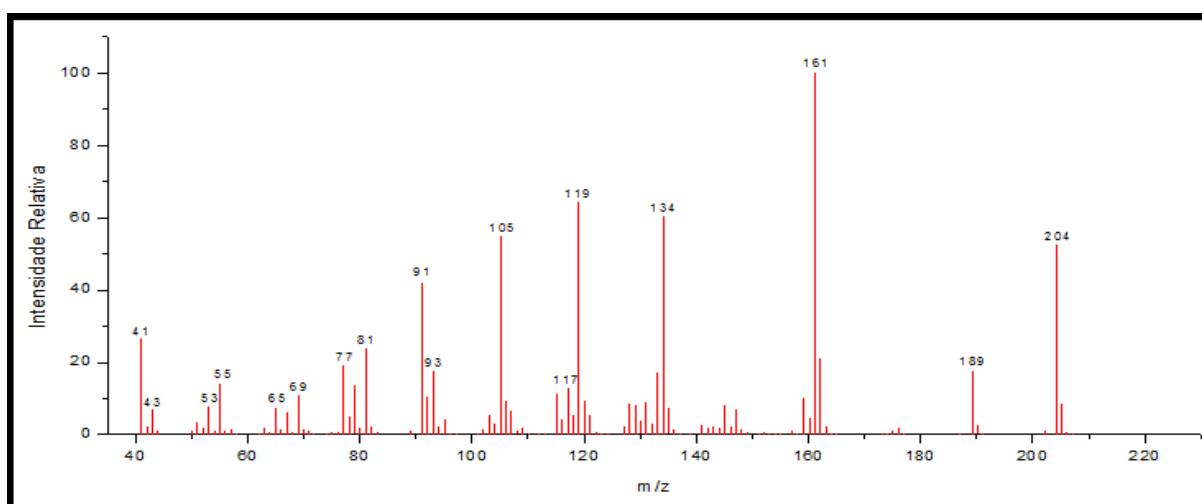


Figura 27. Espectro de massa do  $\delta$ -cadineno.

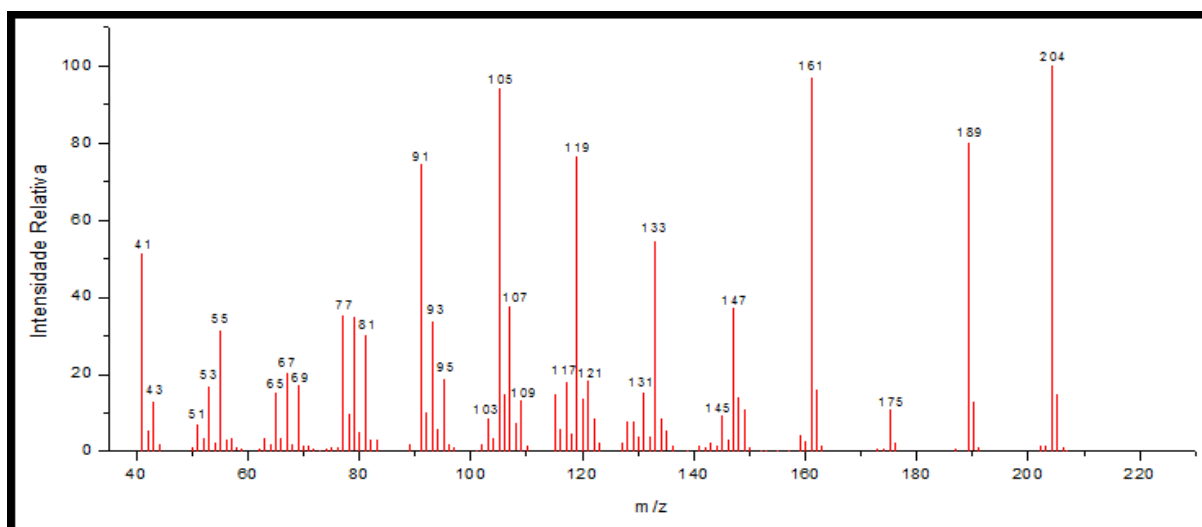


Figura 28. Espectro de massa do cypereno.

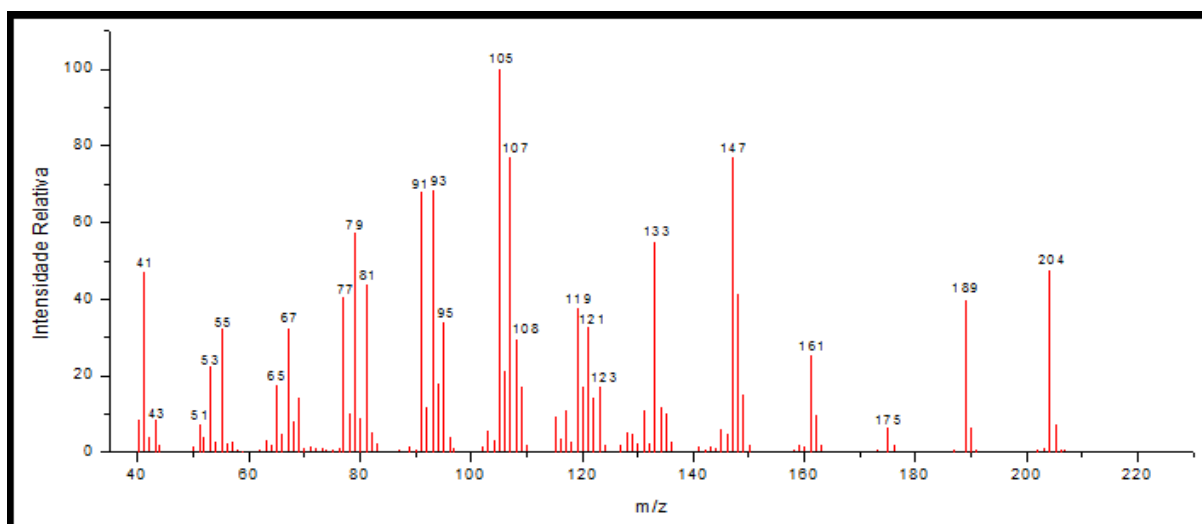


Figura 29. Espectro de massa do  $\alpha$ -guaieno.

## 4.2.6 Análises espectroscópicas do Óleo Essencial de *Lantana camara* Linn

### 4.2.6.1 Espectroscopia Raman

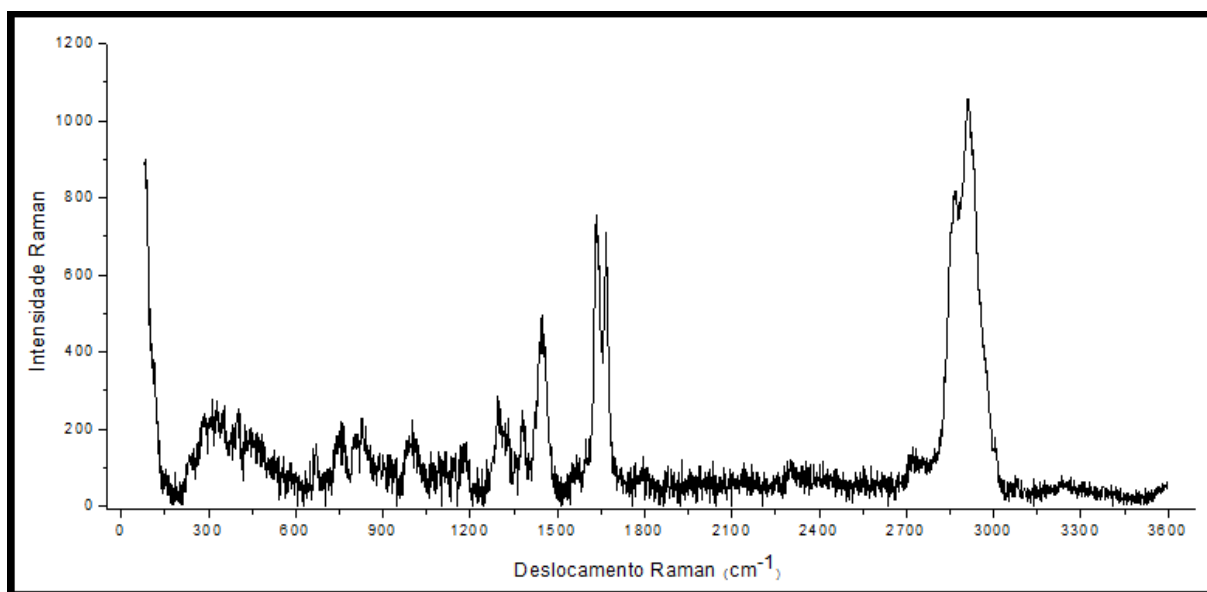
Para determinação das estruturas moleculares presentes nos compostos do OELCL foram realizadas medidas de espectroscopia Raman no intervalo de  $80\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$ . O espectro obtido é mostrado na Figura 30. A Figura 31 apresenta a expansão do espectro

Raman do OELCL compreendido entre  $175\text{ cm}^{-1}$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a Figura 32 apresenta a expansão do espectro Raman do OELCL compreendido entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$ .

A relação entre o espectro obtido e os modos vibracionais dos compostos foi atribuída em base no trabalho de Smith e Dent (2005) (Tabela 16). Observando a Figura 31, em  $312\text{ cm}^{-1}$  e  $405\text{ cm}^{-1}$  podemos observar que as bandas que foram atribuídas à deformação angular de ligações do tipo C-C são ligações bastante comuns nos hidrocarbonetos. Em  $671\text{ cm}^{-1}$ ,  $755\text{ cm}^{-1}$  e  $1295\text{ cm}^{-1}$  observam-se as bandas associadas ao estiramento simétrico de ligações do tipo C-C, ligações presentes nos terpenos e terpenoides de maneira geral.

Uma banda identificada como estiramento de C-O-C aparece no espectro do OELCL em  $823\text{ cm}^{-1}$  (Figura 31). Esse tipo de ligação está presente em moléculas como Humuleno epóxido II, Óxido de Cariofileno e Epóxido de Isoaromadendreno. Em  $999\text{ cm}^{-1}$  a banda associada à deformação axial do tipo C-C presentes em anéis aromáticos evidencia a presença de compostos aromáticos como m-Cymeno, Salicilato de metila, e Eugenol.

O modo de estiramento simétrico C=C presente nas moléculas de terpenos e terpenoides foram observados em  $1634\text{ cm}^{-1}$  e  $1667\text{ cm}^{-1}$ . A banda associada à deformação axial simétrica do grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) é observada em  $2868\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a banda associada à deformação axial assimétrica do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) foi observada em  $2912\text{ cm}^{-1}$ . Na Figura 16 podemos observar que os grupos metila e metileno estão presentes em moléculas como  $\beta$ -trans-Farneseno, Germacreno D,  $\beta$ -Cariofileno, Elixeno, trans-Nerolidol,  $\alpha$ -Humuleno,  $\delta$ -Guaieno, Longifoleno e  $\delta$ -Cadineno; compostos encontrados no OELCL por CG-EM.



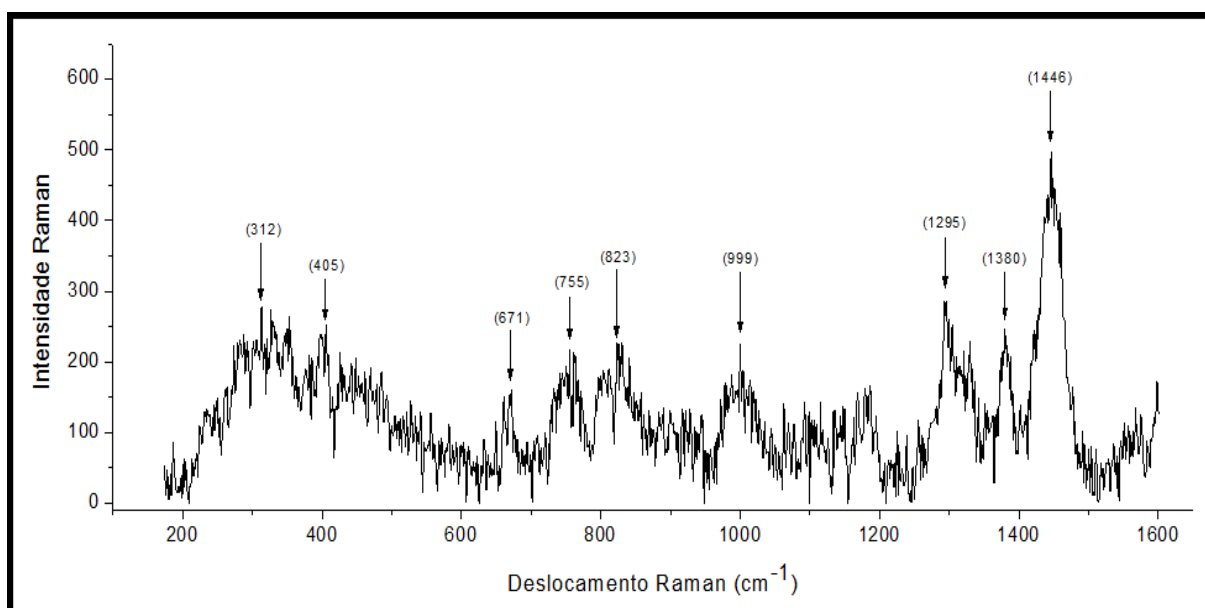
**Figura 30.** Espectro Raman do OELCL no intervalo de  $80$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$ .

Na Tabela 16 são apresentadas a posição e a identificação das bandas observadas nos espectros Raman do OELCL.

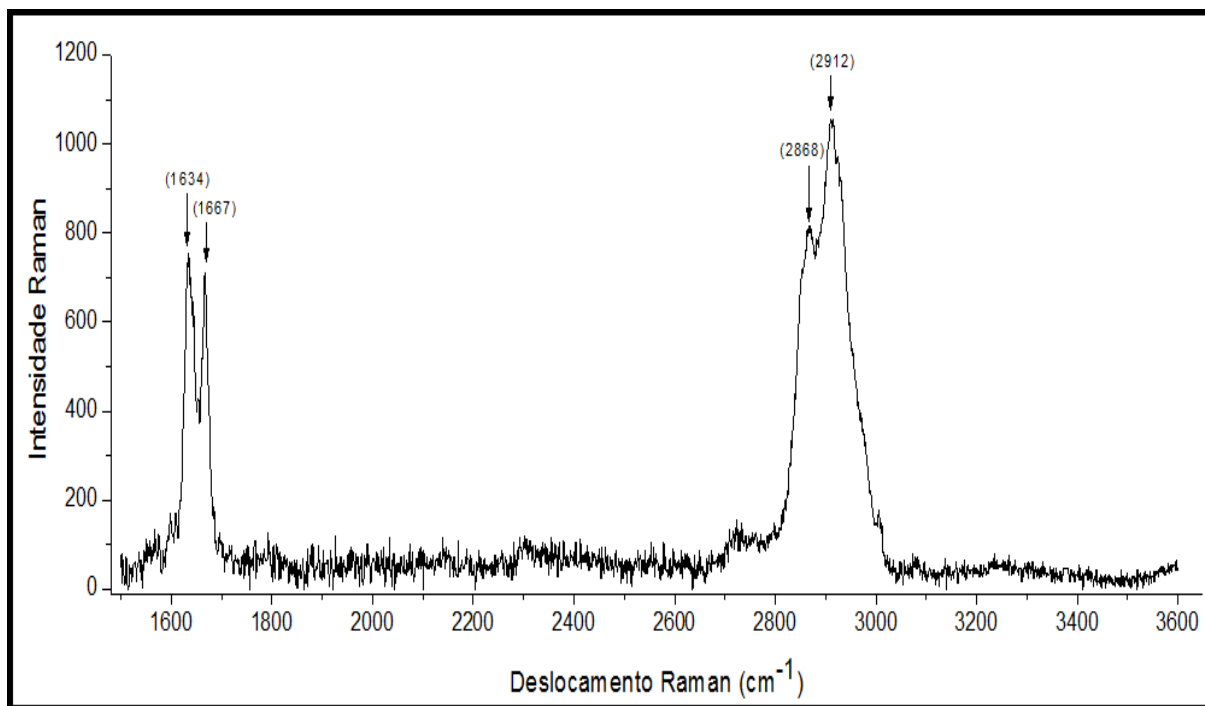
**Tabela 16:** Posição e identificações das bandas observadas nos espectros Raman do OELCL.

Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação dos modos de vibração
312	Deformação angular simétrica C-C - ( $\delta$ C-C)
405	Deformação angular simétrica C-C - ( $\delta$ C-C)
671	Deformação axial (ou estiramento) simétrica C-C - ( $\nu$ C-C)
755	Deformação axial (ou estiramento) simétrica C-C - ( $\nu$ C-C)
823	Deformação axial (ou estiramento) C-O-C - ( $\nu$ C-O-C)
999	Deformação axial (ou estiramento) C-C - ( $\nu$ C-C) Anel aromático
1295	Deformação axial (ou estiramento) C-C - ( $\nu$ C-C)
1380	Deformação angular simétrica $\text{CH}_3$ - ( $\delta$ $\text{CH}_3$ )
1446	Deformação angular simétrica $\text{CH}_2$ - ( $\delta$ $\text{CH}_2$ )
1634	Deformação axial (ou estiramento) C=C - ( $\nu$ C=C)
1667	Deformação axial (ou estiramento) C=C - ( $\nu$ C=C)
2868	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H) Deformação axial (ou estiramento) simétrica $\text{CH}_3$ - ( $\nu$ $\text{CH}_3$ )
2912	Deformação axial (ou estiramento) C-H - ( $\nu$ C-H) Deformação axial (ou estiramento) assimétrica $\text{CH}_2$ - ( $\nu$ $\text{CH}_2$ )

Fonte: Smith e Dent (2005)



**Figura 31.** Expansão do espectro Raman do OELCL compreendido entre  $175 \text{ cm}^{-1}$  a  $1600 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 32.** Expansão do espectro Raman do OELCL compreendido entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

A partir das análises obtidas do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do OELCL foi observado que o OE é formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados (grupos alifáticos) e insaturados (olefinas ou alquenos). Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram encontrados sinais característicos dos grupos funcionais alquila e alqueno, nas regiões 0,60 a 3,00 ppm e 4,00 a 6,00 ppm, respectivamente.

Os picos de deslocamento químico compreendido entre 0,6 a 1,70 ppm podem ser associados ao grupo  $\text{R-CH}_3$ . Esse grupo está presente em todas as moléculas do OELCL encontradas por comparação com os espectros de massa. Ao observarmos a Figura 33 notamos que a integração da área abaixo dos picos entre 0,6 a 1,70 ppm apresenta a maior área comparando-se com o restante dos picos, significando que os hidrogênios mais abundantes do OELCL são hidrogênios do grupo metila.

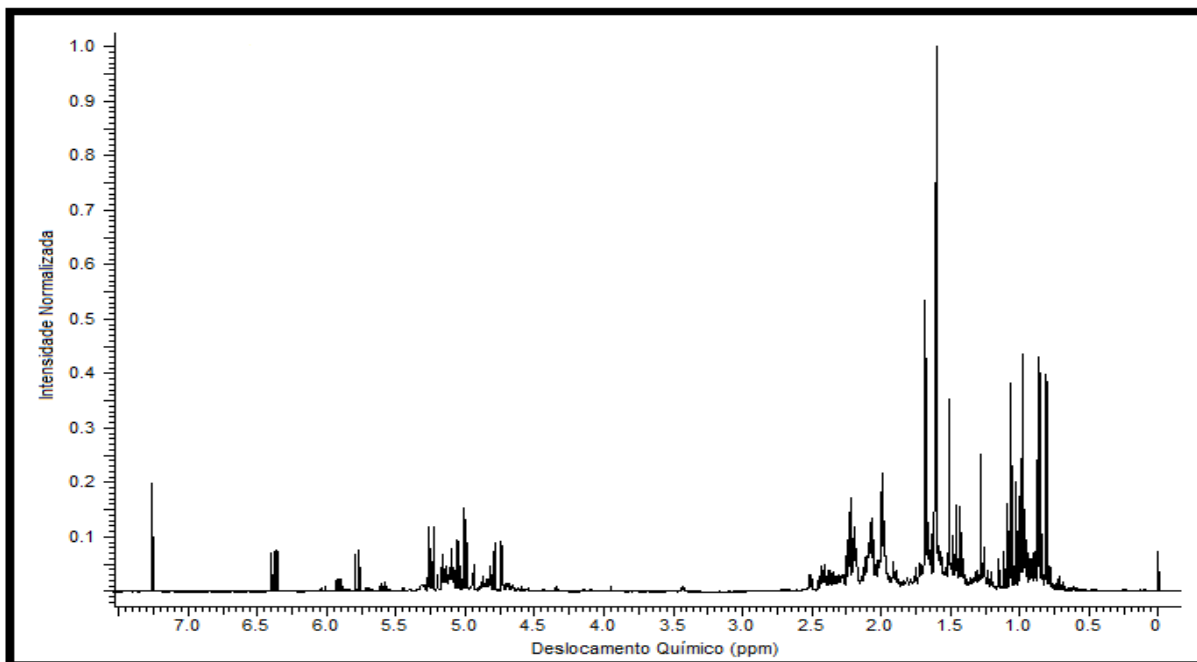


Figura 33. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do OELCL.

Os deslocamentos compreendidos entre 1,80 a 2,50 ppm (Figuras 33 e 34) de uma maneira geral estão associados aos hidrogênios do grupo  $\text{C}-(\text{CH}_2)-\text{C}$ , enquanto os deslocamentos entre 4,70 e 5,30 ppm podem ser associado ao grupo  $\text{R}=\text{CH}_2$  e os entre 5,70 a 6,40 ppm (Figuras 33 e 35) associados aos hidrogênios do grupo  $\text{R}=\text{CH}-\text{C}$ . Observando a Figura 16 constata-se que os compostos majoritários apresentam os grupos acima citados.

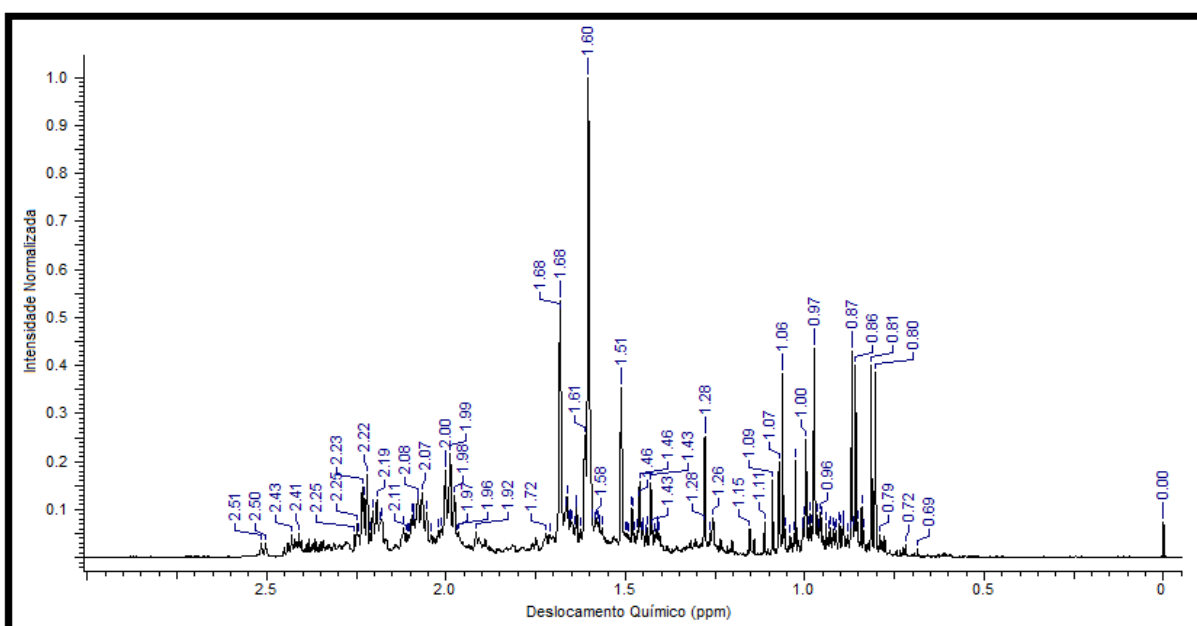


Figura 34. Expansão do espectro RMN de  $^1\text{H}$  do OELCL com deslocamento químico entre 0,0 ppm e 3,0 ppm.

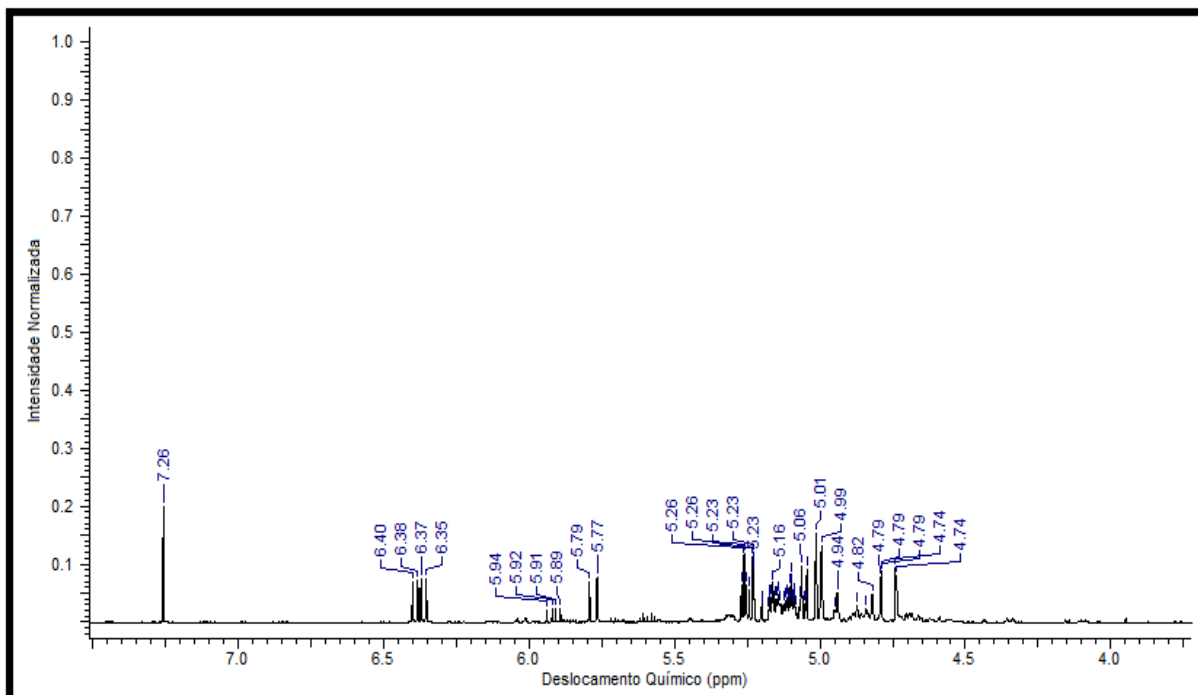


Figura 35. Expansão do espectro RMN de  $^1\text{H}$  do OELCL com deslocamento químico entre 3,5 ppm e 7,5 ppm.

#### 4.3 EHL requerido para o OELCL e Caracterização das nanoemulsões

Após serem submetidas ao teste de centrifugação todas as formulações variando o seu EHL de 8,0 a 15 (Figuras 31 e 32) se apresentaram estáveis, no entanto as formulações com valor de EHL igual a 8,0 (F-1A e F-1B, Tabela 17) obtiveram tamanho dos glóbulos não característico de um sistema nanoemulsionado conforme definição adotada por McClements (2012) e Tadros (2013) que adotam como nanoemulsão um sistema cujo raio médio das partículas dispersas deve ser inferior a 100 nm.

Considerando a nanoemulsão mais estável como sendo aquela que apresenta o maior valor em módulo para o potencial zeta o  $\text{EHL}_{\text{requerido}}$  para o OELCL foi o resultante da formulação preparada com tensoativos cujo valor de EHL era igual a 9,0 (Tabela 17).

Os valores do potencial zeta, do tamanho e do índice de polidispersividade das formulações encontram-se na Tabela 17.



**Tabela 17:** Valores do potencial zeta, do tamanho e do índice de polidispersividade das formulações.

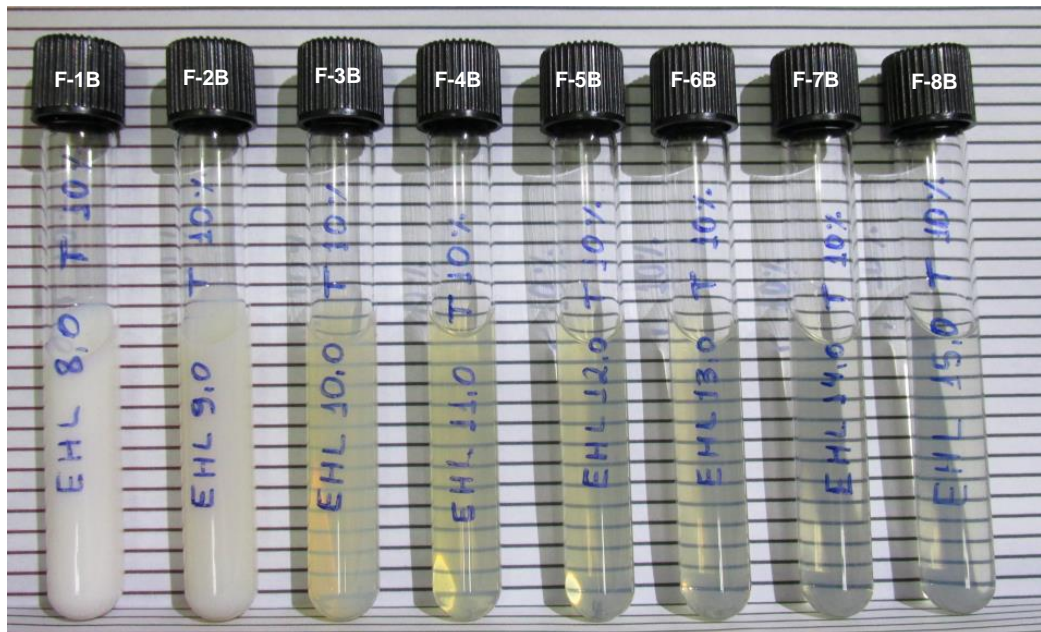
<b>Formulação</b>	<b>EHL do Tensoativo</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersividade</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
F-1A	8	138,10	0,161	-26,90
F-2A	9	92,47	0,164	-19,50
F-3A	10	58,89	0,222	-18,20
F-4A	11	51,47	0,171	-15,50
F-5A	12	44,17	0,204	-13,30
F-6A	13	42,59	0,262	-8,80
F-7A	14	51,24	0,244	-7,63
F-8A	15	119,90	0,305	-9,34
F-1B	8	136,10	0,146	-29,20
F-2B	9	86,36	0,242	-23,50
F-3B	10	40,39	0,276	-20,50
F-4B	11	29,21	0,290	-19,60
F-5B	12	27,83	0,301	-17,20
F-6B	13	26,36	0,281	-11,10
F-7B	14	26,92	0,291	-8,90
F-8B	15	30,26	0,370	-10,80
F-1C	15	18,56	0,287	-9,00
F-2C	15	63,97	0,450	-6,08
F-3C	15	116,90	0,293	-6,41
F-4C	15	29,34	0,381	-9,03
F-5C	15	117,50	0,279	-6,98
F-6C	15	132,10	0,233	-9,33
F-7C	15	93,24	0,318	-9,43
F-8C	15	152,20	0,215	-8,58
F-9C	15	168,40	0,238	-7,13

As emulsões formuladas com base no diagrama ternário foram preparadas com tensoativos com valor de EHL igual a 15, ou seja, o tensoativo utilizado para o preparo dessas emulsões foi o Tween 80, pois com o mesmo obteve-se a emulsão mais transparente, um indicador que o tamanho das gotículas é menor que 100 nm (Figura 33).

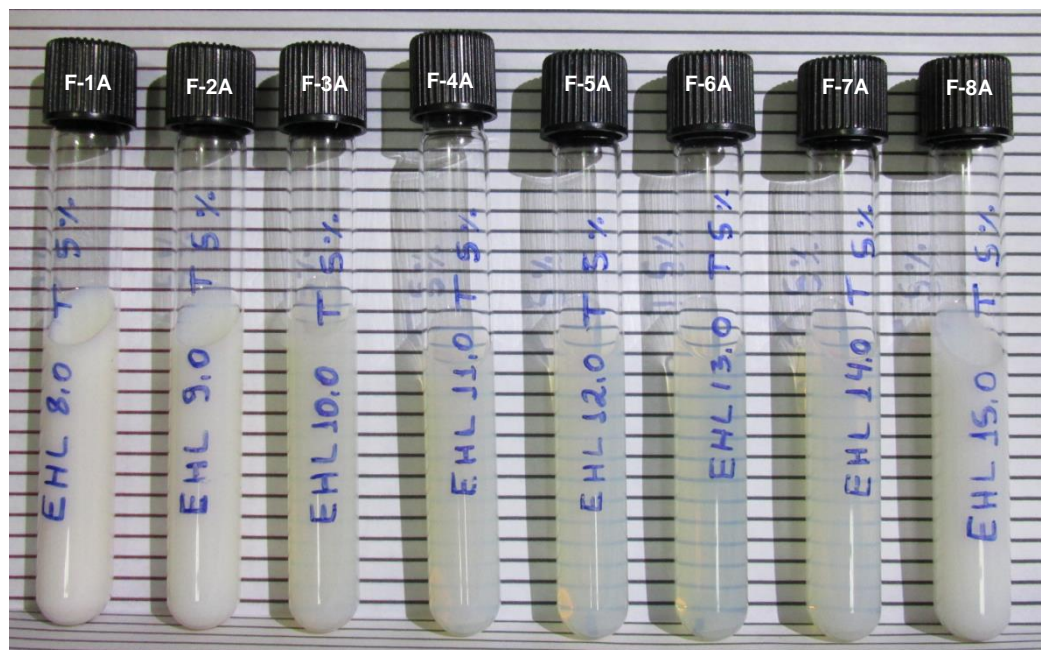
Verificando a Tabela 9 e de acordo com a Tabela 17, nota-se que as melhores nanoemulsões (com menores tamanhos e maior estabilidade) são obtidas quando se utiliza a fase oleosa numa concentração de 5%, enquanto para o tensoativo obteve-se nanoemulsões em concentrações de 10% e 15%. Para o óleo na concentração de 10% apenas a formulação F-2C apresentou tamanho menor que 100 nm, no entanto essa formulação apresentou baixo valor para o potencial zeta (-6,08 mV) indicando uma baixa estabilidade, assim como também apresentou um alto índice de polidispersividade, uma das características que segundo Tadros

et al. (2004) pode desestabilizar as nanoemulsões. Para o óleo na concentração de 15% todas as emulsões obtidas apresentaram tamanho das gotículas maior que 100 nm.

As nanoemulsões que apresentaram transparência foram aquelas com tamanho menor que 30 nm, ou seja, as formulações F-4B, F-5B, F-6B, F-7B, F-8B, F-1C e F-4C. Nas Figuras 36, 37 e 38 é possível observar a transparência das nanoemulsões.



**Figura 36.** Emulsões formuladas com 10% de tensoativos e EHL variando de 8,0 a 15,0.



**Figura 37.** Emulsões formuladas com 5% de tensoativos e EHL variando de 8,0 a 15,0.

A Figura 38 apresenta as emulsões formuladas de acordo com o diagrama ternário. Percebe-se que apenas as formulações F-1C, F-2C e F-4C são transparentes, evidenciando o seu tamanho na escala nanométrica.

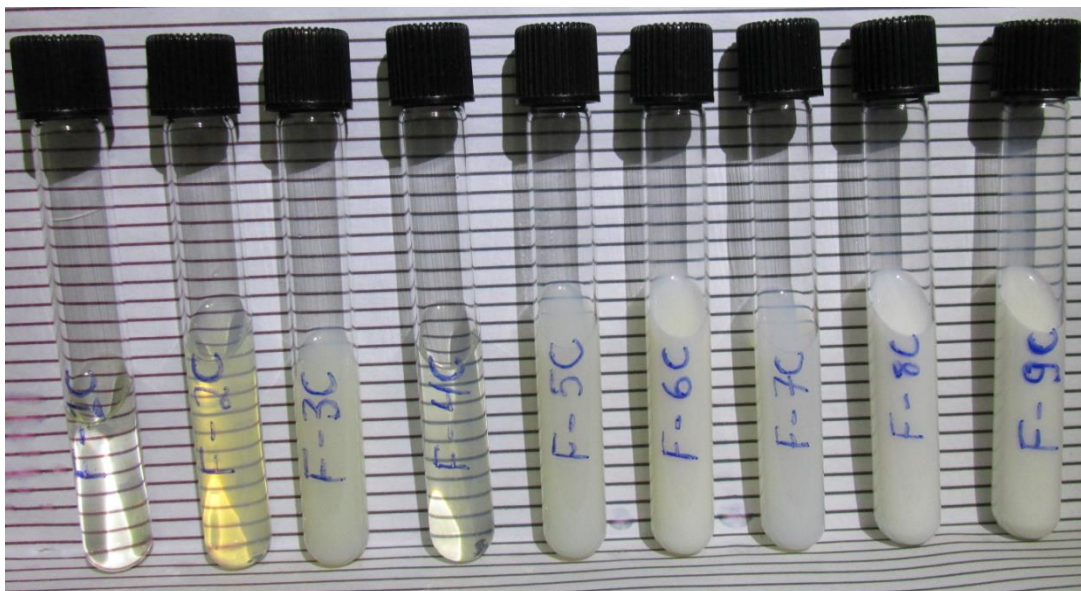


Figura 38. Emulsões formuladas de acordo com o diagrama ternário.

#### 4.4 Teste da atividade anti-leishmania

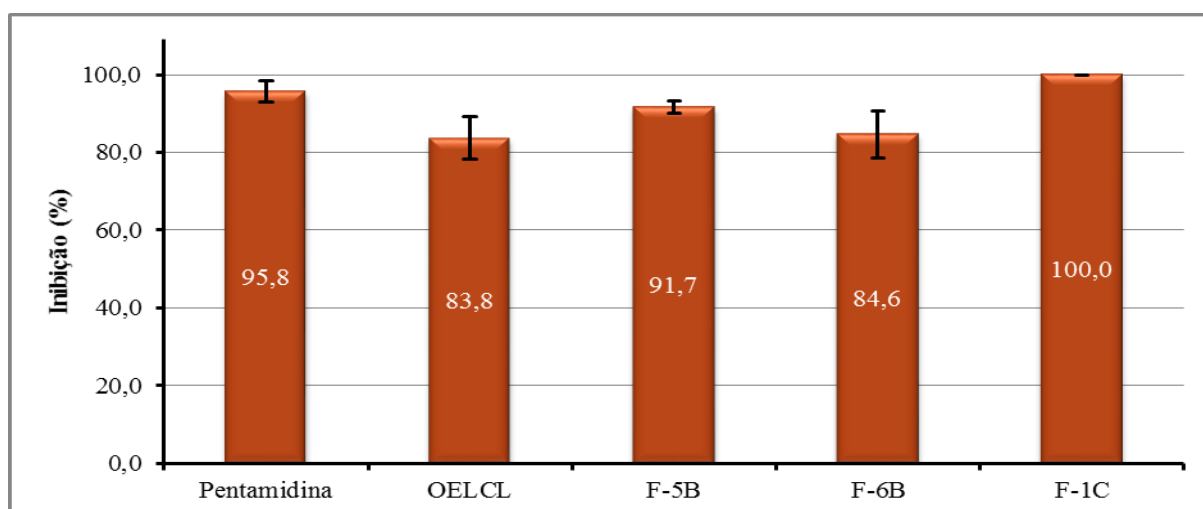
O teste realizado com o OELCL contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* mostrou que o mesmo apresenta atividade de inibição de crescimento na dose testada ( $100 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ), inibindo em 83,8% (Figura 39). As formulações de nanoemulsões do OELCL também foram testadas, sendo elas: F-5B, F-6B e F-1C, todas contendo apenas 5% de OELCL. As nanoemulsões apresentaram valores similares ao OELCL, com valor médio variando entre 84,6% e 100% (Figura 39).

A realização de análise de variância para verificar se existe diferença nas médias entre os grupos tratados por pentamidina, OELCL, F-5B, F-6B e F-1C foi realizada e o resultado é mostrado na Tabela 18. Como o valor F (12,90) encontrado é maior que  $F_{\text{crítico}}$  (3,06) podemos concluir que as médias não são iguais ao nível de significância de 5%, significando que existe diferença nos tratamentos.

Realizou-se o Teste de Tukey para comparar as médias entre os tratamentos, onde as médias estatisticamente diferentes apresentam letras diferentes (Tabela 19). O grupo tratado

com pentamidina mostrou-se estatisticamente diferente do grupo tratado com OELCL, sendo o tratamento com pentamidina mais eficiente. Comparando-se as nanoemulsões com a pentamidina temos a seguinte situação: grupo tratado com pentamidina e grupo tratado com F-5B estatisticamente igual; grupo tratado com pentamidina e grupo tratado com F-6B estatisticamente diferente, onde a pentamidina é mais eficiente, e grupo tratado com pentamidina e grupo tratado com F-1C estatisticamente iguais.

Comparando o OELCL com as nanoemulsões temos que o grupo tratado com OELCL é estatisticamente igual ao grupo tratado com o as formulações F-5B e F-6B e estatisticamente diferente do grupo tratado com F-1C, sendo F-1C mais eficiente.



**Figura 39.** Efeito do OELCL e nanoemulsões sobre formas promastigota de *Leishmania amazonensis*.

**Tabela 18:** Análise de variância entre os grupos testados para atividade anti-leishmania.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	786,505	4	196,6263	12,90	0,0000951	3,06
Dentro dos grupos	228,685	15	15,24567			
Total	1015,19	19				

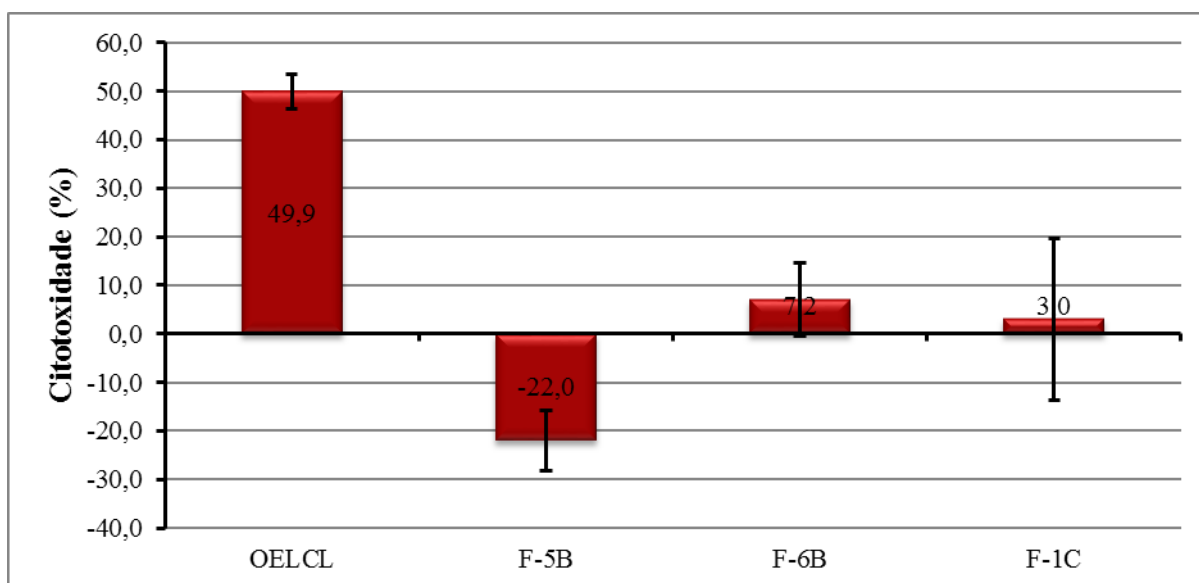
**Tabela 19:** Teste de Tukey realizado para os tratamentos anti-leishmania.

<b>Tatramento</b>	<b>Médias</b>	<b>Diferença mínima Significativa (dms)</b>
Pentamidina	95,8 a	
OELCL	83,8 b	
F-5B	91,7 ab	8,53
F-6B	84,6 b	
F-1C	100 a	

Os valores encontrados para a inibição das nanoemulsões testadas estimulam uma nova avaliação da atividade das mesmas sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*, uma vez que são estas as formas de relevância clínica da doença.

#### 4.5 Teste de citotoxicidade frente aos macrófagos

O ensaio de citotoxicidade pelo método MTT revelou que a presença do OELCL na concentração de  $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$  reduziu a viabilidade dos macrófagos em cultura em 49,9% comparado ao controle, enquanto as formulações de nanoemulsões do OELCL, F-5B, F-6B e F-1C apresentaram valores bem menores: -22,0% para formulação F-5B, 7,2% para F-6B e 3,0% para F-1C (Figura 40).



**Figura 40.** citotoxicidade do OELCL e nanoemulsões em macrófagos murino J774.

Foi realizado teste de análise de variância a fim de verificar diferenças nas médias entre os grupos tratados por OELCL, F-5B, F-6B e F-1C o resultado é mostrado na Tabela 20. Como o valor F (36,8355869) encontrado é maior que  $F_{crítico}$  (3,490295) podemos concluir que as médias não são iguais ao nível de significância de 5%, significando que existe diferença nos tratamentos.

O Teste de Tukey foi realizado para comparar as médias entre os tratamentos (Tabela 21). A partir das análises constata-se que existe diferença entre o tratamento com o OELCL e

com as nanoemulsões, sendo esta última menos citotóxica aos macrófagos. A partir da Figura 40 vê-se que a formulação F-5B propiciou a proliferação de macrófagos e que a diferença entre o tratamento com o OELCL e as nanoemulsões é significativa. Percebe-se ainda que a formulação F-1C apresenta um desvio padrão muito distante da média, o que significa que os dados obtidos para esse tratamento estão muito dispersos, podendo o tratamento ser citotóxico ou até mesmo promover a proliferação, o que torna esse resultado inconclusivo.

**Tabela 20:** Análise de variância entre os grupos testados para citotoxicidade frente aos macrófagos.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	10693,7556	3	3564,585	36,8355869	0,000002479	3,490295
Dentro dos grupos	1161,241777	12	96,77015			
Total	11854,99737	15				

**Tabela 21:** Teste de Tukey realizado para os tratamentos de citotoxicidade frente aos macrófagos.

<b>Tatramento</b>	<b>Médias</b>	<b>Diferença mínima Significativa (dms)</b>
OELCL	49,9 a	
F-5B	-22 c	20,65
F-6B	7,2 b	
F-1C	3,0 b	

As formulações F-5B e F-6B apresentaram citotoxicidade menor que o OELCL, uma das possíveis explicações é o fato das nanoemulsões testadas conterem em suas formulações apenas 5% do OELCL, diminuindo assim a quantidade do OELCL e como consequência levando a diminuição da citotoxicidade.

## 5 CONCLUSÕES

O OELCL obtido por hidrodestilação a partir das folhas secas coletadas no município de Rio Branco teve um rendimento médio de 0,25 (v/m) tendo como principal constituinte o  $\beta$ -trans-Farneseno (29,07%), tendo como constituinte também o Germacreno D (24,84%),  $\beta$ -Cariofileno (10,89%), Elixeno (4,81%),  $\alpha$ -Cariofilenol (4,39%), trans-Nerolidol (4,37%),  $\alpha$ -Humuleno (3,76%),  $\delta$ -Guaieno (2,04%), Longifoleno (1,26%),  $\delta$ -Cadineno (1,16%) e outros.

O OELCL é composto em sua maioria por sesquiterpenos, apresentando 31 compostos dessa classe ( $C_{15}H_{24}$ ), representando 83,04% do óleo, 16 compostos sesquiterpenoides (13,33%), 9 compostos monoterpenos (1,12%), 6 compostos monoterpenoides (0,30%), 1 composto diterpenoide (0,13%) e outros 12 compostos (1,59%).

A partir da caracterização físico-química do OELCL foram apresentados novos dados como o índice de refração que apresentou um valor de 1,504 a 40 °C; a densidade com valor de 0,8284 g.mL<sup>-1</sup>; o índice de acidez com valor médio de 1,55 mg KOH/g; o pH com valor médio de 5,99; bem como os espectros Raman e RMN de <sup>1</sup>H.

As análises do espectro Raman nos mostrou que os compostos são ricos em grupo metila e metileno e também em dupla ligação (C=C).

As análises do espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H nos mostrou que o OELCL é formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados (grupos alifáticos) e insaturados (olefinas ou alquenos).

A análise por CG-EM mostrou que o OELCL estudado contém 76 compostos, e em sua maioria sesquiterpenos, onde a maioria dos compostos foram encontrados também em outros trabalhos de pesquisa sobre o OELCL dando confirmação a nosso trabalho.

Foram obtidas nanoemulsões preparadas pelo método de emulsificação ultrassônica com tamanho e estabilidade desejáveis.

O OELCL e as nanoemulsões testadas contra formas promastigota de *Leishmania amazonensis* apresentaram alta inibição contra a espécie.

O OELCL apresentou-se citotóxico frente aos macrófagos de camundongos enquanto as nanoemulsões apresentaram baixa citotoxicidade e até mesmo permitiram a proliferação dos mesmos.

Os resultados obtidos dos testes biológicos indicam viabilidade de estudos posteriores mais aprofundados contra formas amastigotas da *Leishmania amazonensis* que são as formas que apresentam relevância clínica da doença.



## REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; HAYAT, K.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; ZHANG, X. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139-157, 2013.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual review of biomedical engineering**, v. 14, p. 1-16, 2012.

ALITONOU, G.; AVLESSI, F.; BOKOSSA, I.; AHOUSSE, E.; DANGOU, J.; SOHOUNHLOUÉ, D.C.K. Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 10-11, p. 1101-1105 out./nov. 2004.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Atkins' Physical Chemistry**. Eighth Edition. New York: Oxford University Press, 2006. 1053p.

BAJAJ, B.; MALHOTRA, B.; CHOI, S. Preparation and characterization of bio-functionalized iron oxide nanoparticles for biomedical application. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1219-1223, 2010.

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

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

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

BERNARDI, D.S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. 2011, 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BEZERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, supl.I, p. 692-707, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. Ed. atual. – Brasília : Editora do Ministerio da Saude, 2010.180 p.

COSTA, J. G. M.; SOUSA, E.O.; RODRIGUES, F.F.G.; LIMA, S.G.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos

essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 710-714, jul./set. 2009.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 372p.

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

DEENA, M.J.; THOPPIL, J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 453-455, 2000.

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

DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C. D.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 43-46, jan./fev. 2006.

DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; DASH, A. P. Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. **Indian Journal Medical Research**, v. 131, n. 3, p. 434-439, mar. 2010.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A química na natureza**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. 70p. (Coleção Química no cotidiano, v. 7).

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

FIOCRUZ, Agência de Notícias, **As Leishmanioses**. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/leishmaniose> > Acesso em 8 de junho de 2015.

FIOCRUZ, Laboratório de Imunomodulação, **As Leishmanioses**. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm> > Acesso em 8 de junho de 2015.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 690p.

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

GHISALBERTI, E. L. Review: *Lantana camara* L. **Fitoterapia**, v.71, n. 5, p. 467-486, 2000.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 26, n. 4, p. 401-407, 1993.

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

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

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

HORNYAK, G. L.; DUTTA, J.; TIBBALS, H. F.; RAO, A. **Introduction to nanoscience**. New York: Crc Press, 2008.

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

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

JAWONISI, I. O.; ADOGA, G. I. Chemical Constituents of Essential Oil of *Lantana camara* Linn. Leaves. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 155-157, ago. 2013.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química nova na escola**, v. 9, p. 9-13, 1999.

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

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

KHAN, M.; SRIVASTAVA, S.K.; SYAMASUNDAR, K.V.; SINGH, M.; NAQVI, A.A. Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India. **Flavour Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p.75 -77, 2002.

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

KUMARASAMYRAJA, D.; JEGANATHAN, N. S.; MANAVALAN, R. Pharmacological review of *Lantana camara* L. - review article **International Journal of Pharmacy & Industrial Research**, v. 2, n. 1, p.1-5, jan./mar. 2012.

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

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

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

LOURENÇO, C.O. **Avaliação da atividade de diferentes venenos de serpentes, nativos ou irradiados, com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  quanto ao poder inibitório do crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2000. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.

MACHADO, J.G. **Funcionalização de Nanopartículas de Óxido de Ferro com Glucosamina**. 2014, 96f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MACHADO, R.R.P.; VALENTE JÚNIOR, W.; LESCHÉ, B.; COIMBRA, E.S.; SOUZA, N.B.; ABRAMO, C.; SOARES, G.L.G.; KAPLAN, M.A. C. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1011-1017, set./out. 2012.

MALVERN INSTRUMENTS®. Zeta potential: Theory of operation. In: Zetasizer theory Manual. p. 2.1-2.6. 1996.

MARQUES, E. T. Da nanociência à nanotecnologia: A realidade do futuro. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 3, p. 33-37, 2014.

MARTINS, J. N.; SANTOS, D.C.; ALEXANDRINO, S.P.S.; OLIVEIRA, E.N.A.; CASTELLÓN, R.E.R. Obtenção e caracterização físico-química do extrato oleoso de alho roxo (*Allium sativum*). **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.3, p.01-04, set. 2010.

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

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

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

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

MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. Cengage Learning, 2007. 1344p.

MEDEIROS, L.B.P.; ROCHA, M.S.; LIMA, S. G.; SOUSA JÚNIOR, G.R.; CITÓ, A.M.; SILVA, D.; LOPES, J.A.D.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; MOBIN, M. Chemical constituents and evaluation of cytotoxic and antifungal activity of *Lantana camara* essential oils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1259-1267, nov./dez. 2012.

MEDRANO, J. J. A.; RODRIGUEZ, A. F. R. Sínteses, caracterização Físico-Química, espectroscópica e cromatográfica do óleo essencial de *Croton cajucara* Benth. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 66., 2014, Rio Branco. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFAC, 2014. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/66ra/resumos/resumos/6709.htm>>. Acesso em: 09/07/2015.

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

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

MOURA, S. C. S. R; VITALI, A. A.; FRANÇA, V. C. L. Propriedades termofísicas de soluções modelo similares a creme de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 209-215, mai./ago. 2001.

MURUGESAN, S.; RAJESHKANNAN, C.; BABU, D. S.; SUMATHI, R.; MANIVACHAKAM, P. Identification of insecticidal properties in common weed *Lantana camara* Linn by Gas Chromatography and Mass Spectrum (GC-MS-MS). **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 5, p. 2754-2759, 2012.

OTTOBELLI, I.; FREITAS, J. R. Atividade antioxidante dos extrato brutos e substâncias isoladas de *Philodendron scabrum* K. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* Aubl. (Fabaceae). In: MOSTRA DE PESQUISA E INOVAÇÃO NA EDUCAÇÃO PROFISSIONAL NO ESTADO DO ACRE, 1., 2011, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: IFAC, 2011. p. 134-143.

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

PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G. D.; BARBASTEFANO, R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. **Revista Gestão Industrial**, v. 2, n. 02, p. 65-75, 2006.

QIAO, R.; YANG, C.; GAO, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6274-6293, 2009.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RANDRIANALJAONA, J.A.; RAMANOELINA, P.A.; RASOARAHONA, J.R.; GAYDOU, E.M. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L.: Essential oils from Madagascar. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 46-52, 2005.

REIS, J. M.; COSTA, W.F.; MINGUZZI, S.; SILVA, R.C.L. Avaliação da composição química e da toxicidade do óleo essencial de folhas e frutos da *Jatropha gossypifolia* L. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 185-192, jul./dez. 2013.

RIAZI, M. R.; ROOMI, Y. A. Use of the refractive index in the estimation of thermophysical properties of hydrocarbons and petroleum mixtures. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 40, n. 8, p. 1975-1984, 2001.

SAIKIA, A.K.; SAHOO, R.K. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Lantana camara* L. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 599-602, 2011.

SANTANA, I.A.M.; BARBOSA, R.S.; OLINDA, T.M.; GONÇALVES, D.O.; COSTA, J.G.M.; CALOU, I.B.F. Avaliação do potencial gastroprotetor do óleo essencial de *Lantana camara* Linn (verbenacea). **Revista e-ciência**, v. 2, n. 1, p. 1-16, ago. 2014.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NETO, O.G.R. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 6 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 99).

SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Chemistry for pharmacy students - general, organic and natural products chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 383 p.

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

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

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

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 185p.

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

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

SILVA, D. D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. D. S.; MOUCHREK-FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei korstermans* utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 461-465, 2003.

SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; LUZ, A.I.R.; SILVA, J.D.; MAIA, J.G.S. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. **Flavour Fragrance Journal**, v. 14, n. 4, p. 208-210, 1999.

SILVEIRA, F.T.; MÜLLER, S.R.; SOUZA, A.A.A.; LAINSON, R.; GOMES, C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

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

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 Ed. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2013. 490 p.

SINGH, R. K. TIWARI, B.; SHARMA, D.K.; SINGH, S.P. Comparative Study of Chemical Composition of *Lantana Camara* Leaf, Flower & Fruit Essential Oil. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 546-550, jul./sep. 2012.

SINGH, R. K; TIWARI, B. Composition of *Lantana camara* leaf essential oil. **International Journal of Phamaceutical and Development**, v. 3, n. 7, p. 51-55, out. 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. 999p.

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

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

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

SONIBARE, O. O.; EFFIONG, I. Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana Camara* L. leaves from Nigeria. **African Journal Biotechnology**, v. 7, n. 15, p. 2618-2620, ago. 2008.

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

SOUSA, E. O.; ALMEIDA, T.S.; MENEZES, I.R.A.; RODRIGUES, F.F.G.; CAMPOS, A.R.; LIMA, S.G.; COSTA, J.G.M. Chemical Composition of Essential Oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and Synergistic Effect of the Aminoglycosides Gentamicin and Amikacin. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 2, p. 144-150, 2012.

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

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

TAKEDA, H. H.; JANEGITZ, B. C.; MEDEIROS, R. A.; MATTOSO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 755-760, 2012.

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

TEIXEIRA, D.P.; MENEZES, J.E.S.A.; SANTIAGO, G.M.P; SANTOS, H.S. Composição química e avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Lantana camara* L. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindoia. **Resumos...** Águas de Lindoia: SBQ, 2010. p. 365.

TREGUIER, J. P.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions and water-surfactant-oil diagrams. A system of water-Brij 92 and 96-oil of Vaseline. Effect of surfactante hydrophilicity. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 50, p. 421-431, 1975.

VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de Copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002.

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

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

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

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



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

WEN, L.; PAPADOPOULOS, K.D. **Effects of Osmotic Pressure on Water Transport in W(1)/O/W(2) Emulsions**. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 235, n. 2, p. 398-404, mar. 2001.

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

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. (versão eletrônica). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

ZHONG, Y.; WANG, J.; WANG, Y.; WU, B. Preparation and evaluation of liposome-encapsulated codrug LMX. **International journal of pharmaceutics**, v. 438, n. 1, p. 240-248, 2012.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. GC and GC/MS analyses of the Algerian *Lantana camara* leaf essential oil: Effect against *Sitophilus granarius* adults. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 3, p. 291-297, jul. 2012.