



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PABLO QUEIROZ LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS EMULSIONADOS PARA
VEICULAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus*,
Schinus terebinthifolius e *Plectranthus amboinicus***

Tese de Doutorado

**Recife-PE
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS EMULSIONADOS PARA
VEICULAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus*,
Schinus terebinthifolius e *Plectranthus amboinicus***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de Concentração: Obtenção e
Avaliação de Produtos Naturais e
Compostos Bioativos**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira
Soares

Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen
Oliveira

Recife-PE
2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Susyleide Brito, CRB4-1141

L864d Lopes, Pablo Queiroz.
Desenvolvimento de sistemas emulsionados para veiculação dos
óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* e
Plectranthus amboinicus / Pablo Queiroz Lopes. – 2016.
183 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Óleos voláteis. 2. Emulsões. 3. Estabilização. 4. Anti-infecciosos. 5.
Micoses. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2017-021)

PABLO QUEIROZ LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS EMULSIONADOS PARA
VEICULAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus*,
Schinus terebinthifolius e *Plectranthus amboinicus***

Tese de Doutorado submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, em cumprimento às exigências
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 21/10/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Presidente da Banca)

Profa. Dra. Rosali M^a Ferreira da Silva (Membro interno)

Profa. Dra. Danielle C. A. S. de Santana (Membro externo)

Profa. Dra. Edeltudes de Oliveira Lima (Membro externo)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães (Membro externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

AGRADECIMENTOS

Antes de expressar qualquer gesto ou palavras, primeiramente agradeço a **Deus** pelo dom da vida.

Ao meu 1º orientador, **Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares**, por acreditar no meu potencial, pela amizade, compreensão, confiança e orientação em todos os momentos deste estudo.

Ao meu 2º orientador, **Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira**, com sua sabedoria, paciência, otimismo e amizade, que tudo fez para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao **Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos – NUDATEF** da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, pela disponibilidade da sua estrutura física e técnica, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas-LSVM** da Universidade Estadual da Paraíba, pelo suporte técnico dispensado na execução dos trabalhos realizados neste projeto.

Ao **Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPB)**, **Laboratório Multiusuário do Departamento de Engenharia de Materiais (UFPB)**, **Núcleo de Caracterização e Análise-Nucal (UFPB)**, pela parceria e apoio no desenvolvimento do projeto.

Aos Professores **Robson Veras Cavalcanti, Edeltrudes de Oliveira Lima**.

A minha amiga **Magda Assunção** pelo apoio e logística em Recife.

Aos meus amigos **Aratã Cortez, Ana Letícia, Adriano Alves, Sócrates Golzio, Sandro Leal** pelo apoio na realização dos experimentos.

Em especial, **a mulher da minha vida (Fabiola Bernardo Carneiro)** por me incentivar e apoiar nas horas mais difíceis desta jornada e por aguentar o meu stress e a minha ausência nos fins de semana, madrugadas. A ela a minha gratidão.

Em especial, aos meus filhos **Gabriela Carneiro Queiroz e Pablo Queiroz Lopes Filho**, são os meus corações batendo fora do peito.

A toda família **Bernardo Carneiro**, que me acolheu de forma incondicional em seu seio, incentivando e apoiando meus passos e que hoje sinto-me parte integrante.

Finalmente, agradeço **a minha família** por me apoiar, incentivar nos meus estudos e acreditar no meu potencial. Ao apoio e amor incondicional de meus pais **Vangerlindo de Queiroz Monteiro e Mara Lopes Queiroz**.

Resumo

Nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas tem despertado um grande interesse por óleos essenciais como agentes antimicrobianos, isso se deve à grande incidência de infecções e a crescente resistência de bactérias e fungos aos antimicrobianos clássicos. Considerando que os óleos essenciais possuem características lipofílicas, sendo insolúveis em água e prontamente rancificados e oxidados, quando expostos à luz. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar sistemas emulsionados contendo os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus*, avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro* e *ex vivo*, como também, avaliar a toxicidade aguda. As emulsões possibilitam veicular numa mesma formulação substâncias hidrofílicas e lipofílicas permitindo obter um sistema estável e proporcionando uma melhor absorção dos óleos essenciais. As propriedades químicas dos óleos essenciais foram determinadas por Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. As emulsões contendo óleos essenciais foram preparadas pelo método de inversão de fases variando as proporções de EHL de 4,7 a 16,7. O estudo de estabilidade foi determinada utilizando índice de cremagem, pH, condutividade e quantificação dos marcadores. A atividade antifúngica foi avaliada frente à cepas de *Candida albicans* (ATCC-90028, LM-108 e LM-86), *Candida tropicalis* ATCC-13803, LM-6 e LM-14), *Candida krusei* (LM-13 e LM-08); e a atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923, M-117 e LM-197) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853, A-03 e LM-260). Para o estudo de toxicidade aguda, os animais foram tratados por via oral com as emulsões durante 14 dias com dose única (1000 mg/kg). Os efeitos toxicológicos foram investigados sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e hematológicos. A caracterização química do *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* (fruto e folha) e *Plectranthus amboinicus*, resultou na identificação dos constituintes majoritários 1,8-cineol, α -pineno, limoneno e carvacrol, respectivamente. As emulsões contendo *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* (fruto e folha) e *Plectranthus amboinicus*, apresentaram no estudo a curto prazo uma variação de índice de cremagem de 3,4 a 5,9%. O estudo a longo prazo apresentou índice de cremagem à temperatura ambiente e 5°C entre 0,0 e 15,46%, respectivamente e uma faixa de pH entre 2,5 a 13; condutividade entre 50 a 1600 μ S; e os teores dos marcadores variando entre 0,0 e 95%. A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que os óleos essenciais e as emulsões apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana mostrando faixa de inibição 33 a 88%, respectivamente. O estudo toxicológico agudo das emulsões contendo *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius*-folha e *Plectranthus amboinicus* revelou pequenas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Tais alterações não comprometeram a saúde geral dos animais tratados, nem foram observadas mortes durante o período experimental, sugerindo baixa toxicidade das emulsões utilizadas nesse estudo. Dessa forma, os resultados obtidos permitiram alcançar os objetivos propostos de obtenção e caracterização de sistemas emulsionados, sinalizando perspectivas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos para tratamento das micoses.

Palavras-Chaves: Óleos voláteis. Emulsões. Estabilização. Anti-infecciosos. Micoses.

Abstract

In recent years, the pharmaceutical industry has aroused great interest in essential oils as antimicrobials agents due to high incidence of infections and the increasing resistance of bacteria and fungi to antimicrobials classics. Whereas the essential oil have lipophilic characteristics, being insoluble in water and readily rancidity and oxidized when exposed to light, the aim of this study was to obtain and characterize emulsion systems containing essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* and *Plectranthus amboinicus* beyond to evaluate the antifungal and antibacterial activity in vitro and ex vivo, as well as to assess the acute toxicity. The emulsions enables vehicular hydrophilic and lipophilic substances same formulation allowing to obtain a stable system, providing a better absorption of the essential oils. The chemical properties of essential oils were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Emulsions containing essential oils were prepared by the phase inversion method HLB varying proportions of 4.7 to 16.7. The stability was determined using creaming index, pH, conductivity, quantitation of markers. The antifungal activity was evaluated from the strains of *Candida albicans* (ATCC-90028, LM-108 and LM-86), *Candida tropicalis* ATCC-13803, LM-6 and LM-14), *Candida krusei* (LM-13 and LM-08); and the antibacterial activity from the strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923, M-117 and LM-197) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853, A-03 and LM-260). For the acute study, the animals were orally treated with the emulsions for 14 days with a single dose (1000 mg/kg). The toxicological effects were investigated on behavioral, biochemical and hematological parameters. The chemical characterization of *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* (fruit and leaf) and *Plectranthus amboinicus*, resulted in the identification of the major constituents 1,8-cineole, α -pinene, limonene and carvacrol, respectively. The emulsions containing *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* (fruit and leaf) and *Plectranthus amboinicus*, presented in the short-term study a variation of CI 3.4% to 5.9% and long-term study showed creaming index at room temperature and 5 °C between 0.0 and 15.46%, respectively and a pH range between 2.5 to 13; conductivity between 50 to 1600 μ S; and the content of the markers varying between 0.0 and 95%. The evaluation of antifungal activity showed that the essential oil and the emulsions showed antifungal and antibacterial activity showing a range of inhibition 33% to 88%. The acute toxicological study of emulsions containing *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius*-leaf and *Plectranthus amboinicus* revealed minor changes in hematological and biochemical parameters. These changes did not affect the overall health of the animals treated nor deaths were observed during the trial period, suggesting low toxicity of emulsions in the study. Thus, the results obtained allowed to reach the objectives of obtaining and characterization of emulsion systems, signaling promising prospects for the development of new herbal agents for the treatment of mycosis.

Keywords: Oils volatile. Emulsions. Stabilization. Anti-infective agents. Mycoses.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1- Fotografia de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	28
Figura 2- Fotografia de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	30
Figura 3- Fotografia de <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour	34
Figura 4 - Esquema representativo de sistema emulsionado O/A.....	39
Figura 5- Unhas das mãos infectadas por micose	42
Figura 6- Patogênese da Onicomicose.....	42

CAPÍTULO I

Figura 1- Rendimento dos óleos essenciais de <i>S. terebinthifolius</i> (OEst-folha) e <i>P.amboinicus</i> (OEPa) em função do tempo de extração, a temperatura de 100°C, Médias \pm Desvio Padrão (n=4).....	54
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1- Avaliação do índice de cremagem para o estudo de estabilidade à curto prazo, segundo a técnica microhematocrito, de emulsão contendo óleo essencial de <i>E. globulus</i> (EEg), <i>S. terebinthifolius-fruto</i> (ESt fruto), <i>S. terebinthifolius-folha</i> (ESt folha) e <i>P. amboinicus</i> (EPa)	67
Figura 2- Resultados para as determinação de pH durante estudo de estabilidade (1 a 180 dias) de emulsões preparadas com os óleos essenciais de <i>E. globulus</i> (OEEg), <i>S. terebinthifolius-fruto</i> (OEst fruto), <i>S. terebinthifolius-folha</i> (OEst folha) e <i>P. amboinicus</i> (OEPa)	77
Figura 3- As curvas de condutividade das emulsões contendo os óleos essenciais de <i>E. globulus</i> (OEEg), <i>S. Terebinthifolius-fruto</i> (OEst fruto), <i>S. terebinthifolius-folha</i> (OEst folha) e <i>P. amboinicus</i> (OEPa) versus, tempo de acordo com as formulações armazenadas a temperatura ambiente	87
Figura 4- Teor de 1,8-cineol em emulsões de OEEg após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.	89
Figura 5- Teor de α -pineno em emulsões de OEst (fruto) após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.....	90
Figura 6- Teor de limoneno em emulsões de OEst (folha) após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.....	90
Figura 7- Teor de carvacrol em emulsões de OEPa após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.....	91
Figura 8- Sistema diagrama fase pseudoternário compostos por Tween 20 [®] e Span 80 [®] (tensoativo), água e óleo essencial de <i>E. globulus</i> (OEEg), <i>S. Terebinthifolius-fruto</i> (OEst fruto), <i>S. Terebinthifolius-folha</i> (OEst-folha). EM-Emulsão, CR-Creme, SF-Separação de Fase, LC-Loção.....	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1- Propriedades físico-químicas de óleos essenciais <i>E. globulus</i> (OEEg), <i>S. terebinthifolius</i> (OEst-fruto), <i>S. terebinthifolius</i> (OEst-folha), <i>P. amboinicus</i> (OEPa)	55
Tabela 2- Composição química do óleo essencial das folhas de <i>E. globulus</i> obtida por CG-EM	56
Tabela 3- Composição química do óleo essencial dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> obtida por CG-EM	57
Tabela 4- Composição química do óleo essencial das folhas de <i>S. terebinthifolius</i> obtida por CG-EM	58
Tabela 5- Composição química do óleo essencial das folhas de <i>P. amboinicus</i> obtida por CG-EM	59
Tabela 6- Parâmetros Cinéticos de Ozawa: ordem de reação (<i>n</i>), fator de frequência (<i>A</i>) e energia de ativação (<i>Ea</i>) de dados termogravimétricos dinâmicos.....	63
Tabela 7- Dados de pressão de vapor dos OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa, 1,8-cineol (CIN), α -pineno (PIN), limoneno (LIM) e carvacrol (CAR), nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 °C.min ⁻¹ , em atmosfera de ar sintético (50 °C.min ⁻¹) (n=3).....	65

CAPÍTULO II

Tabela 1- Valores do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) das emulsões contendo óleo essencial.....	67
Tabela 2- Índice e cremagem (%) em temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de <i>E. globulus</i> (EEg).....	77
Tabela 3- Índice e cremagem (%) em temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de <i>S. Terebinthifolius-fruto</i> (ESt).....	79
Tabela 4. Índice e cremagem (%) em temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de <i>S. Terebinthifolius-folha</i> (ESt).....	80
Tabela 5- Índice e cremagem (%) em temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de <i>P. amboinicus</i> (EPa).....	82
Tabela 6- Parâmetros Cinéticos de Ozawa: ordem de reação (<i>n</i>), fator de frequência (<i>A</i>) e energia de ativação (<i>Ea</i>) de dados termogravimétricos dinâmicos das emulsões contendo óleo essencial de <i>E. globulus</i> , <i>S. terebinthifolius-fruto</i> (ESt-fruto), <i>Schinus terebinthifolius</i> (ESt-folha) e <i>Plectranthus amboinicus</i> (EPa).....	96
Tabela 7- Dados de pressão de vapor das emulsões contendo óleo essencial de <i>E. globulus</i> , <i>S. terebinthifolius-fruto</i> (ESt-fruto), <i>Schinus terebinthifolius</i> (ESt-folha) e <i>Plectranthus amboinicus</i> (EPa). Nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 °C/min., em atmosfera de ar sintético (50 °C/min.).....	96

CAPÍTULO III

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima-CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais de *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) testados sobre leveduras e bactérias, pela técnica de microdiluição (1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$)..... 104

Tabela 2- Concentração inibitória mínima-CIM ($\mu\text{g/mL}$) das emulsões contendo *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa 108

Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) e suas emulsões testadas estirpes fúngicas das unhas fragmentos mãos pela técnica de microdiluição. 110

CAPÍTULO IV

Tabela 1- Evolução ponderal de ratos wistar, machos e fêmeas, tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões de *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda 119

Tabela 2- Consumo de água e ração de ratos *Wistar*, machos e fêmeas, tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões de *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda 120

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos obtidos do soro dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda..... 121

Tabela 4- Parâmetros hematológicos obtidos do plasma dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda 125

Tabela 5- Parâmetros Hematológicos obtidos do plasma dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda 126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água/Óleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
CAR	Carvacrol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Altura Total da Camada de Creme
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CGAR-EM	Cromatografia de Fase Gasosa de Alta Resolução Acoplada a Espectrometria de Massa
CG	Cromatografia de Fase Gasosa
CIM	Concentrações Inibitória Mínima
CIN	Cineol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Caldo Nutriente
COFID	Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados
CR	Creme
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CT	Altura Total da Emulsão
<i>d</i>	Densidade relativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Derivada da Termogravimetria
<i>Ea</i>	Energia de ativação
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EEg	Emulsão de <i>Eucalyptus globulus</i>
EM	Emulsão
EPa	Emulsão de <i>Plectranthus amboinicus</i>
ESt	Emulsão de <i>Schnius terebenthifolius</i>

F	Formulação
FID	Detector Chama
IC	Índice de cremagem
IN	Instrução Normativa
IRA	Índice de Retenção Ajustado
IR	Índice de Refração
LC	Loção
LIM	Limoneno
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
ME	Microemulsão
MET	Técnica de Micro-Emultocrito
MS	Ministério da Saúde
<i>n</i>	Ordem de reação
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Analise
NUDATEF	Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos
O/A	Óleo/Água
OEEg	Óleo essencial de <i>Eucalyptos globulus</i>
OE	Óleo Essencial
OEPa	Óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i>
OES_t	Óleo essencial de <i>Schinus terebinthifolius</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Pressão de vapor
PB	Paraíba
PIN	Pineno
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SP	Separação de Fase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
Rz	Razão de Aquecimento
SQR	Substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde

<i>T</i>	Temperatura
Tf	Temperatura final
TG	Termogravimetria
Ti	Temperatura inicial
Tr	Tempo de retenção

LISTA DE SÍMBOLOS

J/g	Joule por grama
K	Kelvin
UI	Unidades internacionais
v/v	Volume por volume
Δm	Variação de massa
μm	Micrometro
ρ	Densidade de massa
ρ_t	Densidade de massa da substância
D	Dia
$^{\circ}C/min$	Graus Celsius por minuto
<i>onset</i>	Temperatura inicial
cm^{-1}	Por centímetro
<i>endset</i>	Temperatura final
R_t/min	Tempo de Retenção por minuto
min^{-1}	Por minuto
IK	Índice de Kovats

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
3.1. Aspectos Gerais.....	27
3.1.1. <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	28
3.1.2. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	30
3.1.3. <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour.....	33
3.2. Óleos Essenciais.....	36
3.3. Emulsões.....	38
3.4. Onicomiose.....	41
4. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS <i>Eucalyptus globulus</i>, <i>Schinus terebinthifolius</i> E <i>Plectranthus amboinicus</i>.....	48
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1.1 Material Vegetal.....	48
4.1.2 Extração dos óleos essenciais das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Plectranthus amboinicus</i>	48
4.1.3 Determinação do tempo e rendimento de extração dos óleos essenciais das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Plectranthus amboinicus</i>	49
4.1.4 Caracterização Físico-Química dos Óleos Essenciais.....	49
4.1.4.1 Determinação da Densidade Relativa.....	49
4.1.4.2 Determinação do Índice de Refração (IR).....	50
4.1.4.3 Solubilidade em Etanol.....	50
4.1.4.4 Características Organolépticas.....	50
4.1.5 Identificação Química dos Componentes dos Óleos Essenciais.....	50
4.1.6 Estudos Termoanalíticos.....	51
4.1.6.1 Estudos Termogravimétricos (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	51
4.1.6.2 Pressão de Vapor.....	52
4.1.6.2.1. Equação de Antoine e Equação de Langmuir	52
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e de <i>Plectranthus amboinicus</i>	54
4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Óleos Essenciais.....	55
4.2.3 Identificação Química dos Componentes dos Óleos Essenciais.....	56
4.3. Estudos de Análise Térmica.....	60
4.3.1. Termogravimetria (TG)/Análise Térmica Diferencial (DTA).....	60

4.3.2 Cinética de Evaporação.....	62
4.3.2.1 Estudos Cinéticos pelo método de Ozawa.....	62
4.3.3 Pressão de Vapor.....	63
4.4 CONCLUSÃO.....	65
5. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus globulus</i>, <i>Schinus terebinthifolius</i> E <i>Plectranthus amboinicus</i>.....	67
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5.1.1 Preparações das Emulsões.....	67
5.1.2 Estabilidade a Curto Prazo.....	68
5.1.3 Estabilidade a Longo Prazo.....	68
5.1.3.1 Índice de Cremagem.....	69
5.1.3.2 Avaliação do pH.....	69
5.1.3.3 Avaliação de Condutividade.....	69
5.1.4 Quantificação dos Marcadores.....	69
5.1.5 Diagrama de Fases.....	70
5.1.6 Estudos Termoanalíticos.....	70
5.1.6.1 Estudos Termogravimétricos (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	70
5.1.6.2 Pressão de Vapor.....	71
5.1.6.2.1 Equação de Antoine e Equação de Langmuir.....	71
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.2.1 Estudo de Estabilidade a Curto Prazo.....	73
5.2.2 Estudo de Estabilidade a Longo Prazo.....	75
5.2.2.1 Índice de Cremagem.....	75
5.2.3 pH.....	83
5.2.4 Condutividade.....	85
5.2.5 Análise quantitativa dos Marcadores dos Óleos Essenciais em Emulsões.....	88
5.2.6 Diagrama de Fases.....	92
5.2.7. Termogravimetria (TG)/Análise Térmica Diferencial (DTA).....	94
5.2.7.1 Cinética de Evaporação.....	95
5.2.7.1.2 Estudos Cinéticos pelo método de Ozawa.....	95
5.2.7.2 Pressão de Vapor.....	96
5.3 CONCLUSÃO	97
6. CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus globulus</i>, <i>Schinus terebinthifolius</i> E <i>Plectranthus amboinicus</i> E SUAS RESPECTIVAS EMULSÕES....	99
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
6.1.1 Avaliação in vitro da Atividade Antimicrobiana e Antifúngica dos Óleos Essenciais de <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Plectranthus amboinicus</i> e suas respectivas emulsões.....	99
6.1.2 Microorganismos.....	99

6.1.3 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM).....	100
6.1.4 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus globulus</i> (OEEg), <i>Schinus terebinthifolius</i> (OEst-fruto), <i>Schinus terebinthifolius</i> (OEst-folha) e <i>Plectranthus amboinicus</i> (OEPa) e suas respectivas emulsões, em infecções de unhas causadas por <i>Candida albicans</i>	101
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
6.2.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antifúngica dos Óleos Essenciais e das Emulsões contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa.....	103
6.2.1.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antifúngica dos Óleos Essenciais.....	103
6.2.1.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Emulsões.....	106
6.3 Estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais de OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa e suas respectivas emulsões, sobre as Onicomioses causadas por <i>Candida albicans</i>	109
6.4 CONCLUSÃO.....	112
7. CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS EMULSÕES DE <i>Eucalyptus globulus</i>, <i>Schinus terebinthifolius</i> E <i>Plectranthus amboinicus</i>.....	114
7.1 MATERIAL E MÉTODOS	114
7.1.1 Estudo de toxicidade aguda não clínica de emulsões contendo óleo essencial <i>E. globulus</i> , <i>S. terebinthifolius</i> e <i>P. amboinicus</i>	114
7.1.2 Análise Hematológica e Bioquímica.....	115
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
7.2.1 Estudo de toxicidade aguda não clínica.....	117
7.2.2 Avaliação da triagem farmacológica comportamental.....	117
7.2.3 Evolução ponderal	118
7.2.4 Consumo de água e ração.....	119
7.2.5 Parâmetros bioquímicos.....	120
7.2.5.1 Emulsão com <i>E. globulus</i> (EEg).....	120
7.2.5.2 Emulsão com <i>S. terebinthifolius</i> -folha (ESt-folha).....	122
7.2.5.3 Emulsão com <i>Plectranthus amboinicus</i> (EPa).....	124
7.2.6 Parâmetros hematológicos.....	124
7.3 CONCLUSÃO.....	128
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	
APÊNDICE A- CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA) E CURVAS DE ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS, MARCADORES E EMULSÕES.....	160
APÊNDICE B- Technological Evaluation of Emulsions Containing the Volatile Oil from Leaves of <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour.....	164

ANEXOS

ANEXO A - Apresentação do trabalho científico no 10º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, CIFARP 2015, Ribeirão Preto, intitulado: Evaluation of Antifungal and Bacterial Activity in vitro and ex vivo of <i>Plectranthus amboinicus</i> Emulsions.....	175
ANEXO B- Apresentação do trabalho científico no 8º RIOPHARMA, Congresso de Ciências Farmacêuticas, intitulado: EVALUATE THE ACTIVITY ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL IN VITRO THE EMULSIONS CONTAINING ESSENTIAL OIL <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i> RADDI.....	176
ANEXO C- Apresentação do trabalho científico no 8º RIOPHARMA, Congresso de Ciências Farmacêuticas, intitulado intitulado: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF EMUSION PHISICAL STABILITY CONTAINING ESSENTIA OIL FROM <i>EUCALIPTOS GLOBULUS</i> LABILL.....	177
ANEXO D- Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba-CEP/CCS/UFPB.....	178
ANEXO E- Declaração de identificação e caracterização anatômica dos materiais vegetais cultivados na Empresa Laboratório Água Rabelo.....	179
ANEXO F- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Avaliação da Toxicidade Aguda da Emulsão de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill em roedores.....	181
ANEXO G- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Investigaçã da Toxicidade Aguda da Emulsão de <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi em ratos wistar por vial oral.....	182
ANEXO H- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Avaliaçãoda Toxicidade Aguda da Emulsão de <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour em roedores.....	183

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, segundo Oliveira e colaboradores (2011), a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que nas últimas décadas, entre 60 e 80% da população dependeram essencialmente das plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde. Além disso, 80% da população mundial já tinham utilizados medicamentos que são derivados de plantas, em consequência do alto custo dos medicamentos de síntese.

No Brasil pesquisas demonstram que aproximadamente 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (GIRALDI *et al.*, 2010; ROQUE, *et al.*, 2010; BADKE *et al.*, 2011; FIRMO *et al.*, 2012). O interesse pelas plantas medicinais no Brasil é relativamente recente, o que conduziu a ampliação do consumo, incentivando a normatização do setor com implementação e constante revisão de normas técnicas para a produção e comercialização de medicamentos, visando garantir a segurança no uso e eficácia terapêutica aliada à qualidade do produto, de forma a viabilizar que os objetivos pretendidos sejam alcançados (KLEIN, LONGHINI *et al.*, 2010; PERFEITO, 2012).

O governo brasileiro visando à importância desse segmento da economia lançou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), uma ação conjunta entre o governo (através de financiamentos), universidades (pesquisa e desenvolvimento) e indústrias (fabricação) buscando o desenvolvimento de novos medicamentos destinados à população (BRASIL, 2006). Por sua vez, de acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) aprovada pelo Decreto nº 5.813/06 do Ministério da Saúde, é imprescindível garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e produção de fitoterápicos (BRASIL, 2006; FIGEREDO, 2014).

Em maio de 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou o uso de drogas vegetais, através da Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 26, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014). Esta resolução norteia a utilização de drogas e derivados vegetais de forma segura, eficaz e de qualidade.

Os medicamentos fitoterápicos, segundo a RDC Nº 13 de 14 de março de 2013, são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia seja baseada em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2013). Dessa forma, não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BALBINO E DIAS, 2010; BENDAOUD; ROMDHANE *et al.*, 2010)

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas, que inicia pela busca de literatura científica, estudo botânico e fitoquímico, identificação de constituintes do vegetal, caracterização e desenvolvimento farmacotécnico (KLEIN, LONGHINI *et al.*, 2010). Os critérios de desenvolvimento e controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos obedecem aos mesmos rigores dos medicamentos convencionais, sendo exigidas avaliações desde a matéria-prima vegetal, passando pelos derivados, até o produto final. Para conceder o registro de um fitoterápico a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), exige os mesmos procedimentos para o registro de um medicamento sintético (BRASIL, 2014). Estes critérios são importantes para garantir segurança ao usuário de fitoterápicos.

Com a importância do uso de plantas medicinais no cenário nacional, diversos estudos de veiculação dos derivados vegetais vêm sendo realizados pelos setores produtivos do segmento farmacêutico. O intuito de obter novas matrizes biológicas, é substituir os medicamentos sintéticos que perderam eficácia frente a resistência bacteriana (ZANIN *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais possuem composição química complexa constituída principalmente dos derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides (OUSSALAH *et al.*, 2007; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Além disso, possuem características lipofílicas, sendo insolúveis em água, como também, são prontamente rancificados e oxidados, quando expostos à luz (FAZOLIN, ESTRELA *et al.*, 2007). Dessa maneira, antes do desenvolvimento de medicamento contendo óleo essencial, se faz necessário investigar novas matrizes ativas contendo óleo essencial com a finalidade de obter sistemas estáveis, eficazes, seguros e desprovidos de toxicidade (BHATTARAM, GRAEFE *et al.*, 2002; CARNEIRO, DA SILVA *et al.*, 2015).

A veiculação de óleos essenciais em formas farmacêuticas continua sendo um desafio devido à volatilidade, solubilidade, oxidação e estabilidade. Além do mais, os óleos essenciais também podem apresentar diversas incompatibilidades em matrizes biológicas e componentes da formulação, resultando em instabilidades físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2015).

Nesse contexto, os sistemas emulsionados são viáveis para veicular óleos essenciais, uma vez que as emulsões são sistemas dispersos constituído de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de pequenas gotículas, a custos dos agentes emulsificantes. As emulsões podem ser classificadas como emulsão água em óleo (água-óleo), na qual a água é a fase dispersa e o óleo é a fase contínua; ou uma emulsão óleo em água (óleo-água), na qual o óleo é a fase dispersa e a água é a fase contínua (LIMA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2015). As emulsões mais comuns são a do tipo óleo em água (O/A), devido alguns constituintes serem absorvidos de forma mais rápida em virtude da menor proporção de óleo, fáceis de serem removidas e por não apresentarem aspecto oleoso (AULTON, 2008; DALTIN, 2011). Considerando a dificuldade de preparação de sistemas emulsionados, devido à estabilidade, solubilidade e volatilidade dos óleos essenciais, torna-se um desafio obter novas formulações contendo óleos essenciais (FERREIRA *et al.*, 2010; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2015).

Diante do exposto, este trabalho teve como propósito o desenvolvimento de sistemas emulsionados para veiculação dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* Labill, *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Plectranthus amboinicus* Lour. Por fim, foi avaliada a viabilidade das atividades antifúngicas e antibacterianas das referidas espécies vegetais, como também a toxicidade das mesmas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas emulsionados contendo óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* Labill (OEEg), *Schinus terebinthifolius* Raddi fruto (OEst-fruto), *Schinus terebinthifolius* Raddi folha (OEst-folha) e *Plectranthus amboinicus* Lour (OEPa), como também, avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e toxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair óleos essenciais das folhas de OEst e OEPa;
- Identificar os constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais de OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa por cromatografia de fase gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (CGAR-EM);
- Determinar as propriedades físico-químicas dos óleos essenciais;
- Caracterizar os óleos essenciais por análise térmica;
- Obter e caracterizar as emulsões contendo óleos essenciais de OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa utilizando uma mistura de tensoativos não-iônicos;
- Realizar o estudo de estabilidade a curto e longo prazo do sistema emulsionado;
- Construir o diagrama de fase para avaliar a dispersão das emulsões;
- Caracterizar as emulsões por análise térmica;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais e das emulsões contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa;
- Avaliar os efeitos inibitórios dos óleos essenciais OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa e das emulsões em um modelo *ex vivo* de onicomicoses em unhas;
- Avaliar a toxicidade aguda das emulsões contendo óleos essenciais de OEEg, OEst (folha) e OEPa;

REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aspectos Gerais

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal das civilizações, com a finalidade de tratamento, promoção à cura e prevenção de doenças (CORRÊA, SCHNEIDER *et al.*, 2013; ARAÚJO, RUAN *et al.*, 2014). As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem para pesquisas de novos fármacos. Alguns dos constituintes isolados de folhas, raízes, flores e frutos (flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas e terpenos) são os principais responsáveis pelas ações analgésicas, antiinflamatórias, antivirais, hipoglicemiantes, antiespasmódicas, antibacterianas e antialérgicas (CORTES-ROJAS *et al.*, 2015; PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015; SILVA, GONDIM *et al.*, 2006, CARNEIRO, DA SILVA *et al.*, 2015).

As principais características desejáveis em produtos derivados de plantas medicinais são: eficácia, baixa incidência de efeitos colaterais, reprodutibilidade, constância de sua qualidade, a planta deve ser abundante e de fácil cultivo o que mobiliza iniciativas públicas e privadas quanto a pesquisa, desenvolvimento e produção (SOUSA, MELO *et al.* 2008; MORAES, ALONSO *et al.*, 2011).

Com a ampliação da utilização de fitoterápicos e com o objetivo de promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações visando garantir a segurança no uso e sua eficácia terapêutica, o Brasil estabeleceu diretrizes para o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos com base na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto Nº 5.813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006).

Dessa forma, diversos estudos, nas últimas décadas, têm correlacionado à atividade biológica, composição dos constituintes e espécies vegetais como *E. globulus*, *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*. Como também, o desenvolvimento tecnológico para obtenção de sistemas de veiculação dos derivados vegetais para melhorar os parâmetros biofarmacêuticos.

3.1.1. *Eucalyptus globulus* Labill

No Brasil, existem cerca de 23 gêneros de *Eucalyptus*, sendo 4 endêmicos e 1034 espécies, das quais 797 são endêmicas. A espécie *Eucalyptus globulus* Labill é da família Myrtaceae, originária do sudeste da Austrália (RICHARDSON E REJMÁNEK, 2011) e da Tasmânia, sendo uma espécie florestal de vida longa, ecológica e economicamente importante, a qual tem sido extensivamente plantada em todo o mundo (YEOH, BELL *et al.*, 2012), como por exemplo: em áreas subtropicais e mediterrâneas (PIRRALHO, FLORES *et al.*, 2014; PAVELA, 2015). Plantas dessa família se apresentam como arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira e subarbusto, estando presente no Brasil em praticamente todas as regiões geográficas do país. Os principais domínios fitogeográficos dos representantes desta família são: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (MYBURG, GRATTAPAGLIA *et al.*, 2014; ROSÁRIO, BAUMGRATZ *et al.*, 2014).

Figura 1- Fotografia de *Eucalyptus globulus* Labill



Fonte: <<http://aromasquecuran.es/grupoCeucalipto.html>>.
Acesso em: 06 de abril de 2016.

Os constituintes químicos presentes no *E. globulus* são responsáveis pelas propriedades medicinais desta espécie, possuem aplicação terapêutica no tratamento da tuberculose pulmonar (SHERRY E WARNKE, 2004), possui ação analgésica e antiinflamatória (SILVA, ABEBE *et al.*, 2003), expectorante, anestésica e antisséptica.

Estudos também mostram que essa espécie possui ação antimicrobiana contra espécies bacterianas como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (BACHIR E BENALI, 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (TYAGI E MALIK, 2010), além de fungos como *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (MARTINS, FERREIRA *et al.*, 2014). É também, utilizado pela população no tratamento contra asma, bronquite, gripe, infecções helmínticas (BACHIR E BENALI, 2012). Além disso, esta espécie também apresenta outros componentes bioativos como o ácido elágico, ácido gálico e seus derivados (GONZALEZ, CRUZ *et al.*, 2004; AMAKURA, YOSHIMURA *et al.* 2009) sendo assim, uma planta de grande interesse científico.

Dentre os derivados vegetais, segundo Bachir e Benali (2012), o óleo essencial das folhas de *E. globulus* apresentou um excelente efeito inibidor sobre o *S. aureus* em relação a *E. coli* indicando o potencial na utilização como microbiostática, antisséptico ou como agente desinfetante. Nos estudos demonstrados por Boulekba-Makhlouf, Slimani (2013), o extrato de *E. globulus* exibiu uma forte atividade antibacteriana contra as duas espécies gram-positivas: *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. Em estudos realizados por Elaissi (2012), a bactéria gram positiva *S. aureus* apresentou elevada sensibilidade ao óleo essencial de *E. globulus*, no entanto, a bactéria gram negativa *P. aeruginosa* foi resistente.

Os resultados obtidos por Pereira, Dias e colaboradores (2014), revelou que o rendimento da extração utilizando diferentes solventes não esta correlacionada com a atividade antimicrobiana observada. No entanto, os resultados mostraram que o *E. globulus* possui compostos bioativos, que podem ser utilizados como uma alternativa para o tratamento de doenças respiratórias causadas por *P. aeruginosa*. Além disso, Tyagi e Malik (2011) demonstraram que a *E. globulus* foi eficaz na inibição do crescimento microbiano e causou a inibição completa de cepas de fungos e leveduras (TYAGI E MALIK, 2011, PEREIRA, DIAS *et al.* 2014). O óleo essencial de *E. globulus* apresenta propriedades medicinais que podem ser aplicadas em diversas áreas, devido às suas atividades antifúngicas, antibacterianas, e antissépticas. Desta forma, o óleo essencial de *E. globulus* se apresenta como uma promissora alternativa para a utilização no tratamento de doenças respiratórias, infecciosas, como também, apresenta menor risco de intoxicação para o homem e o meio ambiente (PIATI, DE HOLANDA NOZAKI *et al.* 2013).

O óleo essencial poder ser extraído das folhas frescas (SILVA, ABEBE *et al.*, 2003), através de procedimento por hidrodestilação (BACHIR E BENALI, 2012), destilação a vapor (AAZZA, LYOUSSI *et al.*, 2011), extração com fluido supercrítico, extração em Soxhlet com cloreto de metileno (PAVLIC, VIDOVIC *et al.*, 2015) ou extração ultrassônica com etanol (ONISZCZUK E PODGÓRSKI, 2015).

Os componentes encontrados em maiores concentrações no óleo essencial de *E. globulus* são: eucaliptol, α -pineno, γ -terpineno e p-cimeno, tendo como principal componente um metabólito da classe dos terpenoides, o eucaliptol (1,8-cineol) que possui significativa atividade antimicrobiana (TYAGI E MALIK 2010; ĐAKOV *et al.*, 2011 ISHNAVA, CHAUHAN *et al.*, 2013, GOLDBECK, NASCIMENTO *et al.*, 2014).

3.1.2. *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *S. terebinthifolius*, é da família das *Anacardiaceae* sendo popularmente chamada como aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e por vários outros nomes (TONIAL, 2010). Segundo Lorenzi, Matos (2002) é originária da América do Sul e nativa do Brasil, Paraguai, Uruguai além do leste da Argentina, tendo sua ocorrência registrada no Brasil desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul.

Figura 2- Fotografia de *Schinus terebinthifolius* Raddi



Fonte: <http://www.arvores.brasil.mon.br/newaroiravm/index.htm>.
Acesso em: 06 de abril de 2016.

Uma árvore mediana de 5 a 10 m de altura, copa larga, o tronco pode chegar a de 30 a 60 cm de diâmetro com casca grossa, folhas compostas medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura.

A espécie *S. terebinthifolius* apresenta a capacidade de sobreviver a ambientes adversos, como a caatinga, região que possui uma estação seca prolongada, com chuvas irregulares e de elevadas temperaturas. Sendo, portanto, uma planta comum e fácil de ser encontrada e cultivada no Brasil (SOUZA, 2011). Além disso, é uma espécie florestal que vem destacando-se na área medicinal. Possuem potencialidades medicinais e fitoquímicas, graças aos seus metabólitos secundários alcaloides, glicosídeos, cardiotônicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis (AMORIM E SANTOS, 2003; PAWLOWSKI, KALTCHUK-SANTOS *et al.* 2012).

Estudos relatam que as cascas, folhas e os frutos de *S. terebinthifolius* apresentam potencial para a extração dos compostos sendo apontados com grande interesse para a pesquisa (KWEKA, NYINDO *et al.*, 2011; PAWLOWSKI, KALTCHUK-SANTOS *et al.*, 2012; CARLINI, DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2013).

Os principais produtos do *S. terebinthifolius*, são os ácidos graxos, terpenoides, os derivados ácidos 3 α -masticadienoico (schinol) e masticadienoico (SANTANA, SARTORELLI *et al.*, 2012; CARVALHO, MELO *et al.*, 2013). Os metabólitos secundários mais conhecidos da *S. terebinthifolius* são o schinol e o ácido masticadienóico (SANTANA, SARTORELLI *et al.*, 2012). Porém, através de triagens fitoquímicas descritas na literatura, tanto as cascas como as folhas revelaram-se igualmente ricas em taninos e em óleos essenciais. Logo, além do schinol e do ácido masticadienoico, substâncias como a terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebintifólico e o ácido ursólico, figuram entre os metabólitos presentes da *S. terebinthifolius* (AMORIM E SANTOS, 2003).

Os componentes obtidos dos óleos de frutos maduros foram identificados monoterpenos com o δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, α -pineno, mirceno e o-cimeno, seguido pelos sesquiterpenos trans-cariofileno, Y-muruleno, E-a-farneseno, δ -cadineno e epi-a-cadinol (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2013). De acordo com Barbosa (2007) o período de hidrodestilação de 3h demonstrou um rendimento de 4,65% de óleo essencial. As folhas apresentaram baixo rendimento de óleo, que chegou a 0,44% (de ramos sem flores) a

0,11% (ramos com flores) (BARBOSA, DEMUNER *et al.*, 2007). A composição varia bastante entre frutos e folhas de diferentes localidades. No Sul do Brasil, em geral, predominam os monoterpenos, α - e β -pineno, às vezes terpineóis, e os sesquiterpenos D-germacreno, biciclo-germacreno e transcariofileno (SANTOS, ROSSATO *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais dessa planta possuem propriedades antimicrobianas, antioxidante e antitumoral. Estas atividades podem ser atribuídas à presença de determinados constituintes como m-cimeno, pineno, terpineno, limoneno, canfeno e α -funebreno (BENDAOU, ROMDHANE *et al.*, 2010; SILVA, FREITAS *et al.*, 2010, CARVALHO, MELO *et al.*, 2013).

A literatura mostra que a *S. terebinthifolius* possui atividade de cicatrização, propriedades antiinflamatórias, antibacteriana, antifúngica e reparação tecidual (AGRA, FREITAS *et al.*, 2007; SANTOS, DANTAS *et al.*, 2009; FREIRES, ALVES *et al.*, 2010; FONSECA, LEHNER *et al.* 2015).

Cole, Santos (2014), realizou estudo das propriedades antibacterianas demonstrando que as cepas selvagens *E. coli*; *Bacillus sp.*; *Pseudomonas sp.*; *K. oxytoca*; *Corynebacterium sp.*; *Nocardia sp.*; *S. aureus*; *Enterobacter sp.*; *E. agglomerans* e *Streptococcus* testados para óleo essencial de *S. terebinthifolius* mostrou sensibilidade frente ao referido óleo essencial.

Um estudo realizado na Universidade Federal da Paraíba em 2011 mostrou que, a tintura da casca da *S. terebinthifolius* foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* das espécies de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. crusei* pela técnica de difusão em meio sólido (ALMEIDA FREIRES, ALVES *et al.*, 2011). Dessa forma, as pesquisas científicas com *Schinus terebinthifolius* têm demonstrado grande relevância no tratamento de diversas infecções.

3.1.3. *Plectranthus amboinicus* Lour

A família Lamiaceae, também conhecida como família das mentas, é considerada uma das mais importantes famílias de plantas, sendo destaque tanto do ponto de vista econômico como etnobotânico, uma vez que diversas espécies são utilizadas com finalidades medicinais como é o caso de algumas espécies do gênero *Ocimum*, *Mentha*, *Plectranthus* e *Origanum* (ALBUQUERQUE, 1999).

Esta família possui distribuição cosmopolita (YUAN, MABBERLEY *et al.*, 2010) e apresenta cerca de 236 gêneros e de 6900 a 7200 espécies, destas cerca de 32 gêneros 496 espécies são nativas ou naturalizadas no Brasil (HARLEY, 2012).

Uma vez que a família Lamiaceae apresenta uma grande diversidade de compostos biologicamente ativos, observa-se também uma vasta diversidade de atividades como antitumoral (GASPAR-MARQUES, RIJO *et al.*, 2006; VAN ZYL, KHAN *et al.*, 2008), antifúngica (SIMÕES, RIJO *et al.*, 2010) e antibacteriana (STAVRI, PATON *et al.*, 2009; GRAYER, ECKERT *et al.*, 2010; SIMÕES, RIJO *et al.*, 2010). Se tornando importante na busca por novas substâncias farmacologicamente ativas.

Inserido nesta família, destaca-se o gênero *Plectranthus*, compreendendo cerca de 300 espécies distribuídas em regiões tropicais além de África, Índia e Austrália (RICE, BRITS *et al.*, 2011; RAJA, 2012), nas quais já foram relatados a presença de mono, sesqui, diterpenos e compostos fenólicos (LUKHOB, SIMMONDS *et al.*, 2006).

Dentro deste gênero, uma espécie de grande importância é a *P. amboinicus*, com sinonímia *Coleus amboinicus*, *Coleus aromaticus*, *Plectranthus aromaticus*, conhecida popularmente como boldo miúdo, boldo da terra, hortelã da folha grossa, hortelã da folha graúda, malvariço, orégano e orégano francês (IGANCI, BOBROWSKI *et al.*, 2006; WALDIA, JOSHI *et al.*, 2011). O *Plectranthus amboinicus* é uma planta herbácea, perene, suculenta, aromática, medindo cerca de 1 metro de altura, distribuída na África tropical, Ásia e Austrália. Possui caule quebradiço com folhas suculentas de forma ovalada, ápice agudo, bordos dentados e pecíolo grosso. As flores são violáceas, portando odor característico da espécie (RICE, BRITS *et al.*, 2011).

Figura 3 - Fotografia de *Plectranthus amboinicus* Lour



Fonte: Próprio Autor

A espécie *P. amboinicus* é utilizada pela população há décadas para tratar doenças inflamatórias, principalmente de pele, de cunho digestório e respiratório (LUKHOB, SIMMONDS *et al.*, 2006). Também é relatado o seu uso como antiepilético, anticonvulsivante, antiasmático, no tratamento de doenças gástricas, antifúngico, anti-inflamatório, analgésico e antiviral (OLIVEIRA, LIMA *et al.*, 2007; GALVÃO RODRIGUES, COSTA *et al.*, 2013; ARUMUGAM *et al.*, 2016), leishmanicida, no tratamento de infecções respiratórias (GURGEL, DA SILVA *et al.*, 2009), dores de garganta, congestão nasal, reumatismo (RAVIKUMAR, DHANAMANI *et al.*, 2009; PATEL, MAHOBIA *et al.*, 2010), atividades analgésica e antiinflamatória (CHIU, HUANG *et al.*, 2011), no tratamento de úlceras (KUO, CHIEN *et al.*, 2012) e artrite (CHANG, CHENG *et al.*, 2010).

O extrato obtido das folhas *P. amboinicus* também apresentou atividade antimicrobiana contra diversas cepas de *Staphylococcus*, porém foi ineficaz frente *P. aeruginosa* e *Candida ssp* (RUKAYADI *et al.*, 2013). O óleo essencial desta espécie por sua vez, apresentou atividade contra *S. aureus*, *Candida krusei* (NOGUEIRA, DINIZ *et al.*, 2008), *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (MANJAMALAI, ALEXANDER *et al.*, 2012), *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *C. versatilis*, *Fusarium*

moniliforme, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* (MURTHY, RAMALAKSHMI *et al.*, 2009) e *P. aeruginosa* (MANJAMALAI, ALEXANDER *et al.*, 2012).

Quimicamente na espécie *P. amboinicus* já foram relatados a presença de flavonoides, triterpenos, alcaloides como a quercetina (LORENZI, MATOS *et al.*, 2002). Em seu óleo essencial há grande quantidade de mono e sesquiterpenos, já sendo relatada a presença de carvacrol, β -cariofileno, *p*-cimeno, γ -terpineno, timol, eugenol, metil chavicol entre outros compostos (MURTHY, RAMALAKSHMI *et al.* 2009; GONÇALVES, BRAGA *et al.*, 2012). Em muitos estudos, o componente de maior concentração é o carvacrol, variando de 40 a 65% (VIZOSO PARRA, RAMOS RUIZ *et al.*, 1999). Para essa espécie são relatados dois quimiótipos, um rico em timol e outro em carvacrol (OLIVEIRA, YOSHIDA *et al.*, 2011).

De acordo com Joshi, Badakar (2011), os óleos obtidos na Índia, por hidrodestilação das partes aéreas foram analisados por cromatografia em fase gasosa equipado com um detector de ionização de chama (GC-DIC) e cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC/EM) apresentando como principal constituinte o carvacrol (77,16%). Os outros componentes identificados no óleo essencial foram *p*-cimeno, β -cariofileno e *trans*- α - bergamoteno.

El-hawary e colaboradores (2013), revelaram que todos os extratos testados, exibiram atividade contra bactérias gram-positivas, especialmente *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, como também, apresentaram atividade moderada contra *Cândida albicans* e *Cândida parapsilosis*.

O desenvolvimento de medicamento a partir de *P. amboinicus* é promissor devido a sua ampla utilização no tratamento de diversas doenças, por não ter sido relatado toxicidade, como também, podendo ser utilizada tanto por via oral quanto tópica (RICE, BRITS *et al.*, 2011).

Todos esses estudos mostram a importância dos tratamentos dos microorganismos causadores de infecções, bem como a busca por novas estratégias terapêuticas, tendo as plantas medicinais de uso popular como uma fonte rica de novos compostos ativos. Dessa forma, é notório, o aumento no interesse pelas plantas medicinais e fitoterapia pela comunidade científica graças as mais distintas aplicações de uma única espécie no tratamento de diversas doenças.

3.2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) são obtidos de espécies vegetais podendo ser definidos como misturas complexas que compreendem muitos compostos constituídos de substâncias oleosas voláteis dotadas de odor e fragrância característica proveniente de constituintes químicos promotores de ações analgésicas, antissépticas, cicatrizantes, sedativos, expectorantes, estimulantes, etc. Possuem características lipofílicas, sendo insolúveis em água; são prontamente rancificados e oxidados, quando expostos à luz (FAZOLIN, ESTRELA *et al.*, 2007). Portanto, o conhecimento íntimo da composição do óleo essencial permite uma melhor aplicação no uso (SAITO, 2000; HADDOUCHI, CHAOUICHE *et al.*, 2013).

Diversos trabalhos demonstram a ação química e farmacológica de óleos essenciais, como por exemplo, atividade inseticida dos óleos essenciais das espécies *Melampodium longifolia* e *Pulicaria. gnaphalodes* (KHANI E ASGHARI, 2012); atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. (PELISSARI, PIETRO *et al.*, 2010), atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L. e *Mentha piperita* L., atividade antiinflamatória do óleo essencial de *Psidium guajava* (SIANI, SOUZA *et al.*, 2013) e atividade leishmanicida do óleo de *P. amboinicus* (LIMA, 2014).

A quantidade total de óleos essenciais presentes em plantas é em geral baixa (<1% de sua massa total), no entanto, apresentam uma potente atividade terapêutica, que em geral é originada não por um componente apenas, mas sim por uma combinação de diversos componentes (SCHÖNE, VETTER *et al.*, 2006).

Os OE, normalmente, são incolores e suas densidades inferiores à da água, com algumas poucas exceções. Quase sempre são dotados de atividade óptica, com índices de refração elevados (COSTA E CUNHA, 1994).

Na indústria, os óleos essenciais são utilizados na fabricação de diversos produtos, tais como, perfumes, medicamentos, alimentos e cosméticos. O Brasil destaca-se na produção mundial de óleo essencial, mas sofre de problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos

investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário (BIZZO, HOVELL *et al.*, 2009).

Os OE podem ser extraídos de diferentes partes da mesma planta e, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar diferente composição química, características físico-químicas e odores (BORGES, PEREIRA *et al.*, 2012). Embora extraído do mesmo órgão e da mesma espécie vegetal, a composição química do óleo essencial pode variar significativamente em função de épocas específicas estando relacionado a diferentes condições climáticas e de solo (BIZZO, HOVELL *et al.* 2009; BORGES, PEREIRA *et al.*, 2012).

Várias técnicas podem ser empregadas na extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação, extração com solventes orgânicos ou com CO₂ líquido ou destilação por arraste a vapor de água, devendo-se ressaltar que o último processo é o mais utilizado nas extrações, que apresenta bom rendimento, facilidade de execução e custo baixo (CARVALHO FILHO, BLANK *et al.*, 2006; BIASI, 2009; FEITOSA *et al.*, 2015; GUINDANI *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2011).

O processo de extração de óleos essenciais em escala industrial é realizado de três formas de extrações distintas. Essa distinção é feita pela forma na qual se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor. A primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira. Na segunda, chamada de destilação pela água e vapor, a amostra permanece contida em um recipiente logo acima da caldeira, ficando assim separada da água. Na terceira, chamada propriamente de destilação pelo vapor de água, a amostra é mantida em recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador próprio independente (LANÇAS, DÓREA *et al.*, 1997).

Charles e Simon (1990) avaliaram três métodos de extração de óleo, extração por solvente, arraste a vapor e hidrodestilação, utilizando as duas espécies aromáticas, *Ocimum kilimandscharicum* L. e *O. micranthum* L., verificaram que a quantidade obtida por arraste a vapor foi maior em comparação com os outros métodos.

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio das técnicas de cromatografia em fase gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SILVEIRA, SCHEUERMANN *et al.*, 2012; LAFHAL, VANLOOT *et*

al., 2015) sendo importante para confirmar a presença de substâncias ativas, ou classes de grupos químicos, presente na espécie vegetal.

Segundo BASSANI, GONZÁLES (2013), para o desenvolvimento tecnológico de fitomedicamentos, o potencial químico e terapêutico da droga vegetal deve ser preservado e valorizado. A manutenção e a agregação de valor terapêutico requerem, portanto, que a qualidade do produto obtido seja mantida dentro de parâmetros previamente estabelecidos.

Devido os óleos essenciais apresentar complexidade, variabilidade química, susceptibilidade à degradação, elevada volatilidade e insolubilidade em água, se faz necessário à veiculação em sistemas emulsionados estáveis e eficazes. O sistema emulsionado é capaz de transportar moléculas ativas, possibilita melhorar a estabilidade, solubilidade, perfil biofarmacêutico, a ação terapêutica de substâncias ativas, bem como proporcionar proteção contra a oxidação, e permitir a introdução de adjuvantes tecnológicos na formulação (ALLEN *et al.*, 2000; HUNTER, PUGH *et al.*, 2008; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; FLORES *et al.*, 2011)

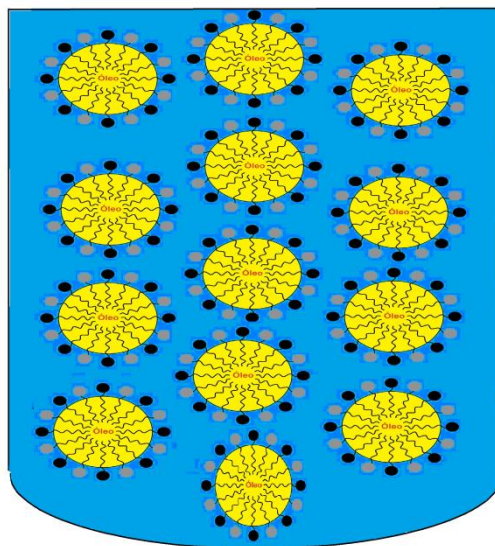
3.3. Emulsões

As emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, formados por dois líquidos imiscíveis entre si, onde um deles encontra-se intimamente disperso na forma de gotículas esféricas. Estas gotículas, também denominadas de fase interna, dispersa ou descontínua, geralmente, apresentam tamanho entre 0,1 a 10 µm e estão envoltos por uma fase externa, também chamada de dispersante ou fase contínua (MCCLEMENTS e RAO, 2011; LAM e NICKERSON, 2013). Estes sistemas são convenientes para incorporação, proteção e liberação de substâncias pouco solúveis em água (LI, ZHENG *et al.*, 2012).

As emulsões podem ser classificadas em emulsões simples ou múltiplas (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015). As emulsões simples podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) de acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante (USHIKUBO e CUNHA, 2014), enquanto que as emulsões múltiplas, também chamadas de emulsões duplas ou de “emulsões de emulsões”, são sistemas multicompartimentalizados, formados, geralmente, por três fases, como água/óleo/água

(A/O/A) e óleo/água/óleo (O/A/O) (O'DWYER, O'BEIRNE *et al.*, 2013; HERZI, ESSAFI *et al.*, 2014).

Figura 4 - Esquema representativo de sistema emulsionado.



Azul - fase aquosa; Amarelo - fase oleosa;
Círculo preto e cinza - tensoativos
Fonte: Próprio Autor.

A estabilidade cinética de uma emulsão é promovida, principalmente, por meio da adição de agentes tensoativos, que são caracterizados como moléculas anfifílicas, por possuírem uma parte polar (hidrofílica) e outra apolar (lipofílica), que formam uma película na superfície da gotícula (PICHOT, SPYROPOULOS *et al.*, 2010; MAINDARKAR, BONGERS *et al.*, 2013). O tensoativo promove a diminuição da tensão interfacial do sistema e forma um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno de gotículas da fase interna, evitando a aproximação destas (YANG, LESER *et al.*, 2013; ZÜGE, HAMINIUK *et al.*, 2013).

Griffin (1949), com a finalidade de sistematizar a escolha do agente tensoativo, desenvolveu um método empírico conhecido como Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), um número adimensional relacionada às propriedades lipofílicas e hidrofílicas do agente. Os tensoativos hidrofílicos geralmente apresentam $EHL \geq 7,0$ e maior tendência para

formar emulsões O/A, enquanto que os tensoativos lipofílicos possuem $EHL \leq 7,0$ e maior predisposição à formação de emulsões A/O (GRIFFIN, 1949; PICHOT, SPYROPOULOS *et al.*, 2010; LOSADA-BARREIRO, SÁNCHEZ-PAZ *et al.*, 2013)

O valor de EHL ideal para emulsionar um óleo, pode ser atribuído por preparação de uma série de emulsões com tensoativos apropriados em uma faixa de valor EHL preestabelecido. O valor EHL obtidos para uma emulsão mais estável será considerado como um valor de EHL ideal do óleo (MORAIS, 2006).

A avaliação de vida útil de emulsões O/A ou A/O é uma das mais demoradas e difíceis questões para os cientistas industriais. O objetivo final é economizar tempo, prever se a emulsão é instável ou não antes da separação de fase em duas camadas visíveis a olho nu (MASMOUDI, LE DRÉAU *et al.*, 2005).

A qualidade de uma emulsão está diretamente relacionada à sua estabilidade. Em emulsões estáveis, as gotículas dispersas mantêm suas características iniciais e permanecem distribuídas por toda fase contínua de maneira uniforme. Em relação a instabilidade termodinâmica das emulsões, a mesma pode ser minimizada ao diminuir o tamanho das gotículas dispersas aumentando a viscosidade da fase contínua, além da escolha da mistura de tensoativos ideais (SAMAVATI, EMAM-DJOMEH *et al.*, 2012).

Durante o armazenamento de uma emulsão, é esperado ser afetado a estabilidade de natureza química, físicas e microbiológicas resultando na instabilidade da emulsão ao longo do tempo (ZARENA, BHATTACHARYA *et al.*, 2012). A instabilidade da emulsão pode ser caracterizada por diversos mecanismos, tais como a cremagem ou sedimentação, floculação, acomodação de *Ostwald*, coalescência e inversão de fases (FRANGE e GARCIA 2010; HUCK-IRIART, ÁLVAREZ-CERIMEDO *et al.*, 2011; GHARIBZAHEDI, MOUSAVI *et al.*, 2012; ZHANG, LIU *et al.*, 2013).

A cremagem (*creaming*) e a sedimentação são processos que ocorrem em consequência à ação da gravidade. A fase dispersa, a depender de sua densidade, pode deslocar-se para a superfície e/ou para o fundo da emulsão, formando uma camada mais concentrada (AULTON E ORTEGA, 2008). A floculação caracteriza-se pela formação de um aglomerado de gotículas emulsificadas, mas com a manutenção do filme interfacial intacto (AULTON e ORTEGA, 2008; FRANGE E GARCIA, 2010). A coalescência trata-se de um processo irreversível que ocorre mediante ruptura do filme entre as gotículas, as

quais perdem sua individualidade, unem-se umas às outras, promovendo a separação das fases (ZÜGE, HAMINIUK *et al.*, 2013). A acomodação de Ostwald ocorre quando as partículas aumentam de tamanho em detrimento à dissolução de partículas menores (FRANGE e GARCIA, 2010). A inversão de fases, por sua vez, é o resultado da troca de posição entre a fase dispersa e o meio, ou seja, o meio dispersante forma gotículas e as gotículas passam a compor a fase contínua (AULTON e ORTEGA 2008; ZÜGE, HAMINIUK *et al.*, 2013).

Dessa forma, o teste de estabilidade de curta e longa duração torna-se uma parte integrante do trabalho de desenvolvimento de emulsão, devendo-se monitorar, durante o referido teste, o pH, condutividade, índice de cremagem, teor de substâncias ativas. (LIANG, GILLIES *et al.*, 2014; ANVISA 2004; TADROS, 2014). À medida que as emulsões se tornam instáveis, suas características físico-químicas variam. Dessa maneira, é possível evitar o desenvolvimento ineficaz de sistemas emulsionados contendo óleos essenciais, sendo o estudo de estabilidade um dos aspectos mais importantes na obtenção de uma emulsão (MORAIS, 2006).

A veiculação de óleos essenciais em sistemas emulsionados vem aumentando, devido ser capaz de carrear e influenciar na estabilidade do óleo essencial, conferir um aumento na biodisponibilidade tornando-o mais eficaz, como também, prolongando o efeito farmacológico das substâncias (COMAS, WAGNER *et al.*, 2006; SOOTTITANTAWAT, YOSHII *et al.*, 2003).

3.4. Onicomicose

As onicomicoses são infecções fúngicas provocadas por dermatófitos (gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*), leveduras (fungos *Candida* spp.) e não-dermatófitos (*Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. E *Scopulariopsis brevicaulis*) que acometem as unhas das mãos e/ou dos pés de, aproximadamente, 5% da população mundial, configurando-se como a mais frequente das doenças ungueais (VEER, PATWARDHAN *et al.*, 2007; SOUZA, FERNANDES *et al.*, 2010; TAUBER E MULLER-GOYMANN, 2014). Nos países em desenvolvimento, a onicomicose espalha-se nas comunidades devido às condições socioeconômicas e a falta de políticas públicas de saúde. O impacto para o paciente não é apenas estético, mas psicológico e social

(BOURGEOIS, CAFARDI *et al.*, 2010; NAZAR, GEROSA *et al.*, 2012; JHA, MAHADEVAMURTHY *et al.*, 2015).

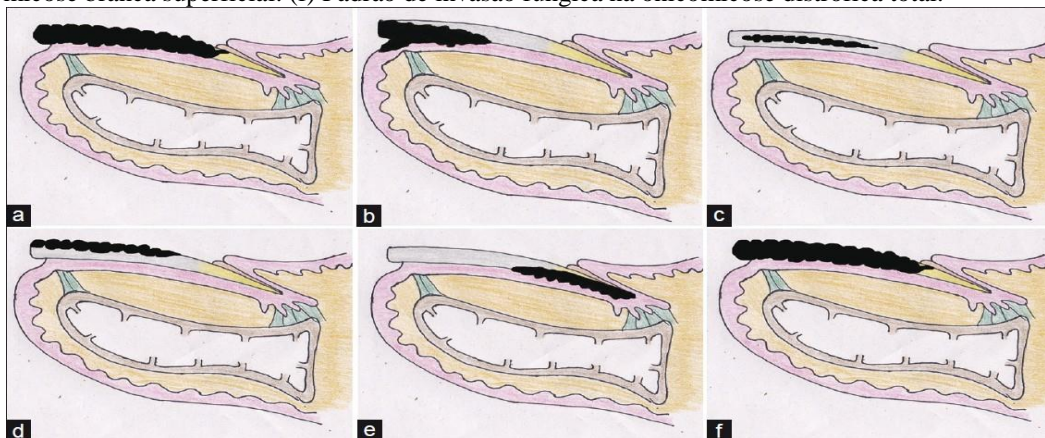
Figura 5- Unhas das mãos infectadas por fungos



Fonte: <<http://medicinaturalvirusfungos.com/category/posts-recomendados/>>. Acesso em: 12 de abril de 2016.

Os fungos aderem à superfície das unhas e depois invadem suas subcamadas. O envolvimento ungueal está relacionado à penetração de elementos fúngicos e secreção de enzimas que degradam os componentes das unhas (GROVER E KHURANA, 2012). De acordo com as alterações ungueais, pode ser classificada em quatro tipos:

Figura 6: Patogênese da Onicomicose (a) Estrutura anatômica da unidade ungueal normal. (b) Padrão de invasão fúngica na onicomicose subungueal distal e lateral. (c) Padrão de invasão fúngica em onicomicose endônica. (d) Padrão de invasão na onicomicose branca superficial. (e) Padrão de invasão fúngica na onicomicose branca superficial. (f) Padrão de invasão fúngica na onicomicose distrófica total.



Fonte: GROVER, 2012.

- (a) Estrutura anatômica da unidade ungueal normal
- (b) Padrão de invasão fúngica na onicomicose subungueal distal e lateral: é o tipo mais comum de onicomicose. O organismo infecta primeiramente o hiponíquio e estende-se de forma lenta e progressiva até a borda proximal da unha.
- (c) Padrão de invasão fúngica na onicomicose endônica: a invasão é um ataque primário e exclusivo sobre a placa ungueal com o fungo crescendo entre as lamelas de placas ungueais. Este padrão de invasão é específico para *T. soudanense* (e possivelmente *T. violaceum*) e pode refletir sua alta afinidade por ceratinas duras.
- (d) Padrão de invasão fúngica na onicomicose subungueal proximal: é relativamente incomum. Ocorre quando o organismo invade a unha por meio da região proximal (cutícula) e migra para a região distal.
- (e) Padrão de invasão fúngica na onicomicose branca superficial: o organismo invade diretamente a camada superficial da lâmina da unha. Com a progressão da infecção, as regiões opacas coalescem e a unha se tornam áspera e mole.
- (f) Padrão de invasão fúngica na onicomicose distrófica total: está relacionado à evolução das lesões, promovendo fragilização e queda de todas as lâminas ungueais.

As onicomicoses causadas por leveduras têm se tornado cada vez mais comuns passando a apresentar um grande percentual de incidência (ELLABIB, AGAJ *et al.*, 2002), inclusive no Brasil (ARAÚJO, BASTOS *et al.*, 2003; SOUZA, MARTINS *et al.*, 2007). Devido à grande variedade de agentes etiológicos, a abordagem terapêutica deve ser estabelecida.

O gênero *Candida* se constitui de fungos dimórficos (DE ROSSI, LOZOVY *et al.*, 2011) medindo aproximadamente de 2 a 6µm e se reproduzem por brotamento; a maior parte das espécies forma pseudo-hifas e hifas nos tecidos. As colônias têm coloração branca a creme e possuem superfície lisa ou rugosa (GOLDMAN E AUSIELLO 2005; NETO, DANESI *et al.*, 2005, AGHAMIRIAN e GHASIAN, 2010). Possui mais de 200 espécies, onde 20 delas são as responsáveis por causar infecções em humanos e são consideradas o principal grupo de fungos oportunistas causadores de doenças. Muitas dessas espécies fazem parte da microbiota normal do indivíduo, colonizando tanto a pele como as mucosas (HOSSAIN, ANSARI *et al.*, 2003; BORG-VON ZEPPELIN, KUNZ *et al.*, 2007;

KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK *et al.*, 2009; NEGRI, BOTELHO *et al.*, 2011).

As infecções provenientes das espécies do gênero *Candida* tem um amplo espectro de doenças tanto superficiais como invasivas podendo acometer pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes (SURJUSHE, KAMATH *et al.*, 2007), sendo as infecções hematogênicas, as formas mais graves (PFALLER e DIEKEMA, 2007; HOLLENBACH, 2008; MÉAN, MARCHETTI *et al.*, 2008; LEROY, MIRA *et al.*, 2010).

Segundo Leite (2010), maior número de pacientes avaliados tinha o diagnóstico clínico de onicomicose das unhas dos pés, representando 74% do total. Quanto às onicomicoses das mãos, os fungos do gênero *Candida* spp. foram os principais envolvidos. Estudos mostram que a análise comparativa dos sexos mostrou persistência de elevado índice de infecção por *Candida* em pacientes do sexo feminino.

De acordo com Araújo, Bastos (2003) foram avaliados 2.271 pacientes e diagnosticada onicomicose em 400 deles, sendo 264 com acometimento das unhas dos pés, e 136 das unhas das mãos. O agente etiológico foi confirmado pelo exame micológico direto e crescimento em cultura. A onicomicose por fungos emergentes representou 4,5% de todas as infecções de unha. Foram detectadas as leveduras do gênero *Candida* (49%) como agentes etiológicos mais frequentes de onicomicoses nas unhas das mãos e em mulheres.

Leite Júnior, Yamamoto e colaboradores (2011) em suas pesquisas diagnosticaram candidíases em profissionais militares e avaliou a frequência dessas infecções nesses indivíduos. A referida pesquisa foi realizada de um total de 197 pacientes estudados, os quais 91 (46,2%) apresentaram quadros clínicos de candidíases. A região genitocrural foi considerada a mais acometida (47,7%), seguida pelas regiões interdigitares (mãos e pés, 27,8%) sendo identificado *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondi*.

A espécie *Candida albicans* pode invadir toda a placa ungueal, causando inchaço, vermelhidão e as infecções persistentes e recorrentes podem causar uma candidíase mucocutânea crônica, que é de difícil tratamento e pode se apresentar de forma grave, ocasionando espessamento, distorção, fragmentação das unhas e inchaço da falange distal (WAGNER E SOHNLE, 1995).

O tratamento de onicomicoses é difícil porque exige vários meses de tratamento, depende do tipo e da gravidade da onicomicose, patologias associadas ao paciente, escolha da droga. Além disso, possui baixa taxa de cura, reincidências elevadas, como também, diversos medicamentos já apresentam resistência devido a utilização frequente em hospitais e a dispensação de forma indiscriminada nas drogarias (PIRACCINI E ALESSANDRINI, 2015).

Esta levedura apresenta diversos mecanismos de virulência, dentre eles cita-se uma maior capacidade de aderência às células epiteliais, a facilidade da invasão fúngica pela presença do dimorfismo, uma vez que ela produz estruturas filamentosas que auxiliam na invasão tissular, bem como a termo tolerância significativa e a produção de proteinases e fosfolipases (COSTA E CUNHA, 1994).

As onicomicoses são as mais difíceis formas de infecções fúngicas superficiais para tratar e mesmo quando o tratamento é feito de maneira correta para o agente etiológico identificado, a cura nem sempre é obtida, podendo esta ter reincidência. Os tratamentos de uso oral e tópico apresentam algumas limitações como efeitos adversos, interações medicamentosas, hepatotoxicidade e desenvolvimento de resistência antimicrobiana devido a utilização frequente em hospitais e farmácias (SHEMER, NATHANSOHN *et al.*, 2010; PIRACCINI E ALESSANDRINI, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, os tratamentos podem ser de uso local, sob a forma de cremes, soluções ou esmaltes. Nos casos de acometimentos superiores a 30% de uma unha ou várias unhas acometidas ao mesmo tempo é necessário tratamento via oral também. A duração é, em média, de 6 meses, podendo chegar a 1 ano, uma vez que se depende do crescimento das unhas (SHEMER, NATHANSOHN *et al.*, 2010).

O tratamento atual para a onicomicose é feito com drogas antimicóticas tópicas ou sistêmicas. A griseofulvina continua a ser, provavelmente, a melhor opção para a dermatofitose devido à boa tolerância em crianças; no entanto, esse agente, amplamente disponível nos Estados Unidos, não é facilmente encontrado em alguns países (DERBY *et al.*, 2011; GUPTA E FIONA, 2013). A estratégia de controle das dermatomicoses infantis consiste geralmente em evitar o uso de antifúngicos orais, sempre que possível, e avaliar cuidadosamente a relação de risco/benefício da terapia escolhida. Griseofulvina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol e terbinafina são recomendados para o tratamento

sistêmico e parecem ser bem tolerados (ARENAS E RUIZ-ESMENJAUD, 2004). Dentre os fármacos utilizados para o tratamento de onicomicoses, tem-se o amorolfina, a bifonazol e ciclopirox-olamina (SHEMER, NATHANSOHN *et al.*, 2010).

A utilização de outros tipos de terapias com drogas vegetais ou derivados vegetais como, por exemplo os óleo essenciais, tem sido empregado com a finalidade de substituir os medicamentos oriundo de síntese química, uma vez que os óleos essenciais apresentam diversos constituintes na sua composição que atuam em vários mecanismos de ação possíveis, devido à diversidade de constituintes na referida composição (SOUZA, KATO *et al.*, 2010).

Capítulo I

Caracterização dos óleos essenciais *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus*

4. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* E *Plectranthus amboinicus*

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Material Vegetal

Os óleos essenciais de *E. globulus* e do fruto de *S. terebinthifolius* foram adquiridos das empresas Glamir[®] (Lote 112) e Laszlo[®] (Lote 027), respectivamente.

Os óleos essenciais das folhas de *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus* foram obtidos por arraste a vapor no Laboratório de Farmacotécnica-UFPB a partir das folhas coletadas no horto do Laboratório Rabelo, localizado na cidade de Cabedelo-PB, em seguida foi identificado e registrado no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba sob nº de registros JPB 54051, 54052 e 54053 (*S. Terebinthifolius*-folha) e JPB 54054 e 54055 (*P. amboinicus*).

4.1.2 Extração dos óleos essenciais das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus*

Os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus* foram obtidos através de arraste a vapor a partir de 2000g das folhas frescas rasuradas, empregando o extrator de óleos Linax[®] (model D2 Mini, São Paulo, Brasil). As referidas folhas foram transferidas para o reservatório do arraste a vapor, que apresentava ciclo de água contínuo, vindo diretamente do sistema de água. Essa água não entrava em contato com a amostra, a mesma era aquecida por uma resistência de calor, evaporava a água e o vapor passava através do reservatório em que se encontravam as folhas rasuradas e arrastavam consigo os constituintes voláteis. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

4.1.3 Determinação do tempo e rendimento de extração dos óleos essenciais das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus*

Para a determinação da cinética de extração, utilizou-se o sistema de arraste a vapor, variando-se os tempos de extração em 1, 2, 3, 4, e 6 horas. Em cada extração, usou-se uma massa de 2000g de amostras. Exceto o tempo, todos os outros parâmetros foram mantidos como descritos anteriormente. A seguir, mensurou-se o volume do óleo, coletou-se e armazenou-se sob refrigeração para evitar perda por volatilização.

O rendimento da extração foi calculado pela relação massa/volume, observando o volume obtido no próprio sistema de extração, como também, na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido de cada óleo por massa (g) das plantas em estudos em porcentagem, conforme fórmula abaixo (BRASIL, 2010).

$$\% R = (V \cdot d / m) \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: V= volume total de óleo extraído (mL), d= densidade do óleo (g/mL) e m= massa da planta (g)

4.1.4 Caracterização Físico-Química dos Óleos Essenciais

4.1.4.1 Determinação da Densidade Relativa

A densidade relativa foi determinada pela Eq. (1) calculando a proporção entre a massa e o volume da amostra a 20 °C, de acordo com:

$$d_{20}^{20} = \frac{m}{v} \quad (2)$$

Onde: d = densidade (g.mL⁻¹); m = massa e v = volume

A densidade relativa foi expressa pela média de três determinações e calculada pela equação 1 (BRASIL, 2010).

4.1.4.2 Determinação do Índice de Refração (IR)

A quantidade de 20 μL de cada óleo essencial foi colocada sob a superfície do refratômetro Reichert[®] (AR-200, California, USA), previamente calibrado com água destilada, e o índice determinado sob luz de sódio no comprimento de 589,3 nm (raio D) e temperatura de 20°C, segundo descrição da Farmacopeia Brasileira, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.4.3 Solubilidade em Etanol

Para se determinar a solubilidade, foi colocado um volume constante de cada óleo e adicionando volumes proporcionais da solução alcoólica previamente preparada a 90% (v/v) até solubilização total (BRASIL, 2010; MONTEIRO, SOUZA *et al.*, 2011).

4.1.4.4 Características Organolépticas

A técnica utilizada foi visual, onde, sob um fundo branco, se comparou a cor de cada óleo com cores conhecidas e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez (BRASIL, 2010).

4.1.5 Identificação Química dos Componentes dos Óleos Essenciais

A identificação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram executadas em equipamento GCMS-QP 2010 Ultra[®], injetor automático AOC-20i, Shimadzu[®]. Para identificação dos óleos, foram preparadas soluções com concentrações de 2 ppm em hexano.

As análises cromatográficas foram realizadas em coluna capilar Rtx[®]-5MS (Restek[®]) (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, Split 1/20, temperatura do injetor 250°C; temperatura inicial da coluna igual a 60°C aquecida em uma razão de 3°C.min⁻¹ até 240°C. O volume de injeção foi de 1,0 μL .

A análise espectrométrica por massas foi operada no modo SCAN com escala de varredura de 50 - 400 u.m.a com impacto de elétrons (70 eV), com temperatura do detector a 250°C. O Índice de Retenção Ajustado (IRA) foi calculado para todos os constituintes voláteis usando uma série homóloga de n-alcanos, que vão desde C8 a C40, (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963). A identificação dos picos foi baseado no Índice de Kovats e similaridade na base de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2008) com 191436 compostos gerais, além da base de dados de Compostos Naturais e Sintéticos, Aromas e Fragrâncias (FFNSC) com 2000 compostos relacionados a fragrância e aromas.

4.1.6 Estudos Termoanalíticos

4.1.6.1 Estudos Termogravimétricos (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas TG e DTA dos óleos essenciais foram obtidos utilizando uma termobalança Shimadzu[®], modelo DTG-60H, sob ar sintético, de fluxo de 50 mL.min⁻¹, com taxa de aquecimento de 10°, 20° e 40°C.min⁻¹ de 25°C até 350°C. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina com uma massa de 18,0 mg ($\pm 0,5$). A ordem da reação (*n*), o fator de frequência (*A*) e a energia de ativação (*E_a*) foram determinados, usando o método de Ozawa a partir dos dados da termogravimetria dinâmicas em atmosferas de ar.

A determinação da faixa de temperatura (inicial e final) da etapa determinante, necessária para aplicar o modelo de Ozawa, foi obtida por dois diferentes modelos de coleta de dados: tangente e observando a curva da derivada primeira (KOGA, 2013).

Os dados termogravimétricos e diferenciais térmicos foram analisados usando um software TASYs da Shimadzu[®].

4.1.6.2 Pressão de Vapor

4.1.6.2.1. Equação de Antoine e Equação de Langmuir

Os dados obtidos dos experimentos termogravimétricos do metilparabeno foram utilizados para construir as curvas de pressão de vapor, utilizando a equação de Antoine, e posteriormente determinar o valor de k'' , o qual será utilizado para a construção das curvas de pressão de vapor dos óleos essenciais e seus respectivos marcadores, utilizando a equação de Langmuir (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004).

O valor de k'' para o metilparabeno na razão de 10, 20 e 40°C.min⁻¹, em atmosfera de ar sintético foram: 125555 (±1,60) e 414034 (±1,50), respectivamente. (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004).

A equação de Antoine (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004) é apresentada como se segue:

$$\ln P = \frac{A - B}{T + C} \quad (3)$$

Onde P: é a pressão de vapor, T é a temperatura absoluta e A, B e C são as constantes de Antoine de um dado intervalo de temperatura (SHAH, TSONG, 1988). As constantes de Antoine registradas para o metilparabeno são: A = 5.23662, B = 1159.34 e C = -220.03, para um intervalo de temperatura de 446-517 K (KOGA, 2013).

A equação de Langmuir (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004) é apresentada como se segue:

$$\frac{dm}{dt} = P \propto \left(\frac{M}{2RT} \right) \quad (4)$$

Onde (dm/dt): é a razão da perda de massa por unidade de área, P é a pressão de vapor, α é a constante de vaporização e M é a massa molecular do vapor de evaporação.

A equação de Langmuir pode ser modificada para obter os valores de pressão de vapor de vários componentes simples. A seguinte modificação é descrita por Hazra, Alexander e colaboradores (2004):

$$P = \left[\alpha^{-1} (2\pi R)^{\frac{1}{2}} \right] \cdot \left[(T/M)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{dm}{dt} \right) \right] = k \cdot \vartheta \quad (4)$$

Onde: $k = \alpha^{-1} (2\pi R)^{\frac{1}{2}}$ e $\vartheta = \left(\frac{T}{M} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{dm}{dt} \right)$

Se k é considerado uma constante para um dado grupo de dados e é independente do material usado, então o gráfico de P versus ϑ dá o valor de k .

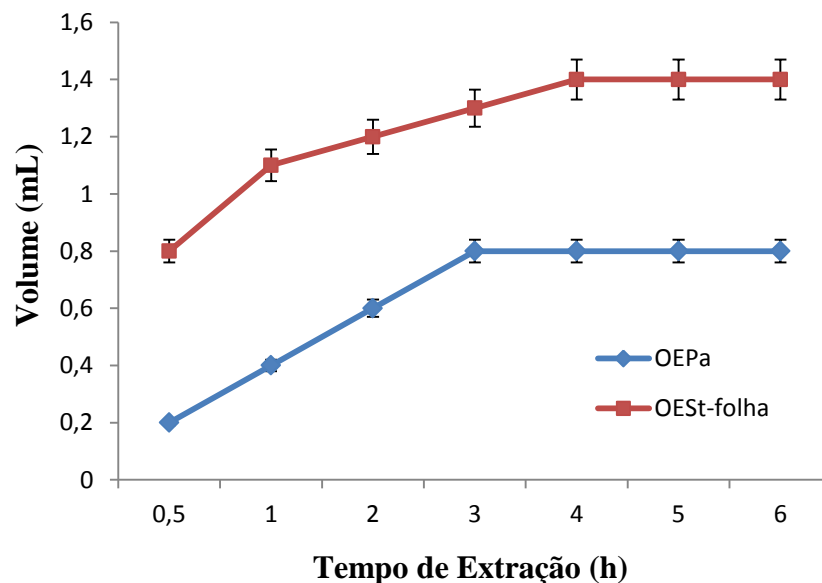
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização dos óleos essenciais tem um papel importante na determinação dos parâmetros de qualidade, o qual inclui o perfil químico, físico-químico e térmico, bem como a atividade biológica dos óleos essenciais de acordo com as suas propriedades farmacológicas e toxicológicas contribuindo para melhorar a utilização terapêutica segura e eficaz da espécie (FERNÁNDEZ DE SIMÓN, MUINO *et al.* 2010, AZMIR, ZAIDUL *et al.* 2013).

4.2.1 Obtenção dos óleos essenciais das folhas de *Schinus terebinthifolius* e de *Plectranthus amboinicus*

Na Figura 1, estão apresentados os resultados obtidos para os óleos essenciais a partir da extração por arraste a vapor das folhas de *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*, nos quais pode ser observado o melhor tempo de extração com maior rendimento do óleo essencial.

Figura 1- Rendimento dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) em função do tempo de extração, a temperatura de 100°C, Médias \pm Desvio Padrão (n=4).



Fonte: Dados da Pesquisa

Os resultados obtidos demonstraram que o melhor tempo de extração do OEst (folha) foi 4 horas para se obter um volume de óleo igual a 1,4 mL, que corresponde ao rendimento máximo do óleo extraível equivalente a 0,28% ($\pm 0,02$) em relação ao peso de material fresco utilizado. A partir desse tempo, a quantidade de óleo extraído de *S. terebinthifolius* permaneceu constante.

Na extração do óleo essencial de *P. amboinicus*, foi verificado que, no tempo de 3 horas o rendimento máximo do óleo extraído de 0,9 mL, equivalente a 0,26% ($\pm 0,03$) em relação ao peso de material fresco utilizado. A partir desse tempo, a quantidade de óleo extraído de *P. amboinicus* permaneceu constante. Dessa forma, de acordo com esses resultados, propõe-se que o tempo de extração para os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*, seja de 4 e 3 horas, respectivamente, que corresponde ao maior rendimento de extração do óleo essencial.

4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Óleos Essenciais

A determinação das características de óleos essenciais é importante para estabelecer critérios de qualidade da matéria-prima. De acordo com as exigências da ANVISA, segundo a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 para a caracterização dos óleos essenciais foram realizados os ensaios físico-químicos de densidade relativa, índice de refração, solubilidade em álcool a 90% (v/v), cor e aparência (Tabela 1).

Tabela 1- Propriedades físico-químicas de óleos essenciais *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha), *P. amboinicus* (OEPa).

Propriedades Físico-Química	OEEg	OEst (fruto)	OEst (folha)	OEPa
Densidade (g.mL ⁻¹)	1,4602 \pm 0,06	1,4771 \pm 0,01	1,4768 \pm 0,04	1,4984 \pm 0,03
Índice de Refração (ND 25°)	0,9090 \pm 0,02	0,8490 \pm 0,02	0,86152 \pm 0,06	0,9167 \pm 0,04
Solubilidade em Álcool a 90% (v/v)	1:1 \pm 0,07	1:25 \pm 0,05	1:6 \pm 0,03	1:2 \pm 0,07
Característica Organoléptica	Incolor	Verde Claro	Verde Claro	Amarelo
	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente

*Médias \pm Desvio Padrão, n= 4.

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados obtidos dos óleos essenciais corroboram com os relatos existentes na literatura a cerca da importância da caracterização dos mesmos. Esta caracterização está relacionada com a natureza, a qualidade e o grau de pureza do óleo, além das condições de conservação (CORRÊA, SCHNEIDER *et al.*, 2013; GALVÃO RODRIGUES, COSTA *et al.*, 2013; SANTOS, LIMA *et al.*, 2013; FERREIRA, DE MORAIS ECHER *et al.*, 2015).

4.2.3 Identificação Química dos Componentes dos Óleos Essenciais

A relação dos constituintes químicos identificados dos óleos essenciais obtidos de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* (fruto), *S. terebinthifolius* (folha) e *P. amboinicus*, estão os compostos, tempo de retenção, área e Índice de Kovats, que são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

A porcentagem de identificação atingida na análise dos óleos voláteis de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* (fruto), *S. terebinthifolius* (folha) e *P. amboinicus* foram acima de 99%, o que permitiu classificar como excelentes os resultados obtidos para estas espécies.

Os compostos, predominantemente, identificados no OEEg foram 1,8-cineol (84,35%), *p*-cimeno (5,91%), limoneno (5,16%) presentes na Tabela 2. Dessa forma, sendo o 1,8-cineol a substância majoritária o qual foi utilizada como marcador.

Tabela 2- Composição química do óleo essencial das folhas de *E. globulus* obtida por CG-EM.

Pico	Compostos	R _t /min.	% Área	I.K.
1	α -Pino	5,965	1,72	934,8673
2	β -Pino	7,213	0,39	979,0442
3	β -Mirceno	7,562	0,58	991,3982
4	α -Felandreno	8,06	0,33	1006,7819
5	<i>p</i> -Cimeno	8,768	5,91	1025,6117
6	D-Limoneno	8,936	5,16	1030,0798
7	1,8-Cineol	9,07	84,35	1033,6436
8	γ -Terpineno	10,021	1,56	1058,9362

R_t/min.- Tempo de Retenção (min.) IK- Índice de Kovats

Fonte: Dados da pesquisa

Foram identificados um total de 14 constituintes do óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius*. Os principais constituintes são: α -pineno (25,57%), limoneno (19,54%), Δ -3-careno (19,63%), *p*-cimeno (15,85%), α -felandreno (14,02%) (Tabela 3).

Tabela 3- Composição química do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* obtida por CG-EM.

Pico	Compostos	R _t /min.	% Área	I.K.
1	α -Thujeno	5,739	0,16	926,8673
2	α -Pineno	5,959	25,57	934,6549
3	Canfeno	6,379	0,17	949,5221
4	Benzeno	6,995	0,4	971,3274
5	β -Pineno	7,2	0,82	978,5841
6	Mirceno	7,548	1,97	990,9027
7	α -Felandreno	8,054	14,02	1006,6223
8	Δ -3-Careno	8,266	19,63	1012,2606
9	<i>p</i> -Cimeno	8,749	15,85	1025,1064
10	D-Limoneno	8,909	19,54	1029,3617
11	α -Terpinoleno	11,169	0,68	1089,4681
12	Neo isothujol	16,038	0,33	1203,8833
13	E-Cariofileno	25,684	0,69	1422,7091
14	Não Identificado	28,304	0,17	1484,4287

R_t/min.- Tempo de Retenção (min.) IK- Índice de Kovats

Fonte: Dados da pesquisa

Para o OEST, obtido das folhas, foram identificados 18 constituintes dentre os principais: limoneno (63,96%), α -pineno (16,38%), *p*-cimeno (4,87%) e α -felandreno (4,44%) (Tabela 4). Os dados deste trabalho diferem dos dados obtidos por Pawlowski e colaboradores (2012), que obteve α -pineno (31,59%), β -felandreno (6,59%), *trans*-o-cimeno (12,32%). Além disso, Santos e colaboradores (2014), encontrou no OEST, obtidos das folhas, os constituintes δ -3-careno (81,79%), α -pineno (12,59%), β -mirceno (2,99%) e (*E*)-cariofileno (3,63%) diferindo dos dados deste trabalho.

Segundo Dourado (2012) e Santosa, Braz-Filho e colaboradores (2015), a variação dos constituintes químicos dos óleos essenciais ocorre devido à influência de vários fatores dentre eles genético, climático, geográfico e composição do solo.

A comparação entre as Tabelas 3 e 4 permite constatar uma maior diversidade na composição e no teor entre os óleos essenciais do fruto e das folhas de *S. terebinthifolius*. O

OE obtido dos frutos, o α -pineno está presente em maior quantidade e o OE obtido das folhas há uma prevalência do limoneno sendo utilizados, consequentemente, como marcadores. Além disso, a principal diferença entre a composição volátil das duas partes da planta foi a ausência do Δ -3-Careno nas folhas, sendo o segundo componente mais abundante nos frutos.

Tabela 4- Composição química do óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius* obtida por CG-EM.

Pico	Compostos	R _t /min.	% Área	I.K.
1	α -Pineno	5,968	16,38	934,97
2	Canfeno	6,394	0,15	950,05
3	β -Pineno	7,211	0,49	978,97
4	Mirceno	7,559	1,3	991,29
5	α -Felandreno	8,061	4,44	1006,81
6	p-Cimeno	8,759	4,87	1025,37
7	D-Limoneno	8,947	63,96	1030,37
8	Isoascaridol	18,261	0,67	1253,78
9	exo-2-Hidroxicineol	21,154	0,26	1318,95
10	α -Copaeno	23,774	0,91	1378,50
11	β -Elemeno	24,476	1,98	1394,45
12	Cariofileno	25,693	0,27	1422,92
13	D-Germacreno	28,317	0,97	1484,73
14	β -Selineno	28,543	0,48	1490,06
15	α -Selineno	28,925	0,59	1499,06
16	Δ -Cadineno	30,074	0,33	1527,11
17	Spathulenol	34,781	0,28	1643,92
18	Ácido ftálico	43,073	1,67	2164,09

R_t/min.- Tempo de Retenção (min.) IK- Índice de Kovats

Fonte: Dados da pesquisa

Em relação ao óleo essencial obtido da folha de *P. amboinicus*, 19 constituintes foram identificados dentro os quais: carvacrol (33,5%), *p*-cinemo (28,02%), γ -terpineno (14,77%) (Tabela 5). Dessa forma, sendo o carvacrol a substância majoritária, consequentemente usada como marcador.

Tabela 5- Composição química do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* obtida por CG-EM.

Pico	Compostos	R _t /min.	% Área	I.K.
1	α -Thujeno	5,757	0,83	927,5044
2	α -Pino	5,969	0,38	935,0088
3	Canfeno	6,392	0,11	949,9823
4	1-Octen-3-ol	7,17	0,74	977,5221
5	β -Mirceno	7,567	2,03	991,5752
6	α -Felandreno	8,068	0,31	1006,9947
7	α -Terpineno	8,48	2,52	1017,9521
8	p-Cimeno	8,783	28,2	1026,0106
9	D-Limoneno	8,921	0,84	1029,6809
10	γ -Terpineno	10,04	14,77	1059,4415
11	α -Terpinoleno	11,19	0,19	1090,0266
12	Linalol	11,599	0,15	1100,7907
13	L-4-terpineol	14,972	1,52	1179,2326
14	Carvacrol	20,608	33,5	1306,5455
15	E-Cariofileno	25,71	4,63	1423,3216
16	γ -Bergamoteno	26,352	3,16	1438,4452
17	α -Humuleno	27,162	1,17	1457,5265
18	Óxido Cariofileno	32,558	0,62	1587,8484
19	Ácido ftálico	43,094	4,32	2164,7484
R _t /min.- Tempo de Retenção (min.)		IK- Índice de Kovats		

Fonte: Dados da pesquisa

A confirmação da presença de carvacrol e *p*-cinemo observada na Tabela 5 corrobora com os relatos existentes na literatura a cerca da importância destes constituintes para esta espécie, em virtude das propriedades biológicas atribuídas (SENTHILKUMAR, ANNADURAI E VENUGOPALAN VENKATESALU, 2010; EL-HAWARY, SEHAM S., *et al*, 2012; GALVÃO RODRIGUES, COSTA *et al.*, 2013; KHALID E EL-GOHARY, 2014). Dessa forma, é necessária a identificação química, uma vez que, segundo Ultee e colaboradores (2002), a presença de *p*-cinemo em quantidades significativas além do carvacrol, é responsável pela elevada atividade antifúngica devido à ação sinérgica destes constituintes.

4.3. Estudos de Análise Térmica

4.3.1. Termogravimetria (TG)/Análise Térmica Diferencial (DTA)

A TGA/DTA foi realizada para determinar a percentagem de perda de massa, perfil térmico e acompanhar o comportamento de degradação térmica, dos OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa uma vez que, as diferentes composições dos óleos essenciais influenciam nas suas propriedades térmicas (ZHANG, PARK *et al.*, 2009).

As curvas termogravimétricas (TG) dinâmicas dos diferentes óleos essenciais obtidos na atmosfera de ar sintético, nas razões de 10°, 20° e 40°Cmin⁻¹. mostraram uma única fase de decomposição e suas perdas de massa. Com o aumento da razão de aquecimento é observado um deslocamento de temperatura de volatilização, que estão apresentados no apêndice A (Figuras 1 a 4).

A decomposição térmica dos OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa apresentou uma perda de massa correspondendo a 101,29; 95,03; 94,28 e 102,19%, respectivamente.

Pela análise da curva TG do OEEg, que houve perda de massa de 101,29 % na faixa de temperatura de 25 a 105°C, em uma única etapa. O 1,8-cineol apresentou na faixa de temperatura de 29,06 a 131,42°C com uma perda de massa de 98,15%.

Nas curvas DTA, analisadas, estão apresentados no apêndice A (Figuras 1), observa-se um evento endotérmico. O OEEg apresentou uma temperatura *onset* de 87,01°C e *endset* de 131,92°C com massa chegando próximo a zero e temperatura de pico em 102,49°C, correspondendo ao ponto de evaporação. O cineol mostrou uma temperatura *onset* de 70,89°C e *endset* de 131,62°C, como também, uma temperatura de pico em 122,31°C, correspondendo ao ponto de evaporação.

No apêndice A (Figuras 2), as curvas de TG do OEst-fruto, evidenciou entre 28,53 e 139,23°C uma perda de massa de 95%. Para o α -pineno, observou uma perda de massa de 96,40%, na faixa de temperatura entre 23,00 a 110°C.

Porém, nas curvas de DTA presentes no apêndice A (Figuras 2), observa-se um evento endotérmico. Para o OEst-fruto apresentou uma temperatura *onset* de 55,87 °C e *endset* de 112,10°C e o ponto de evaporação com uma temperatura de pico de 94,82°C. O

marcado α -pineno a temperatura *onset* foi 77,71 e *endset* 107,24, com uma temperatura de pico de 91,89°C.

Ao analisar as curvas TG do OEst-folha foi observado perda de massa de 94,28% na faixa de temperatura entre 31,21 e 220,67°C. Para o limoneno observou-se que ocorreu entre 29,47 a 190,96°C perda de massa de 95,30 % conforme representado no apêndice A (Figura 3).

Avaliando-se o perfil térmico diferencial (DTA) do OEst-folha, observou-se a temperatura de pico de 119,27°C, cuja temperatura *onset* foi 84,6°C e *endset* 153,90°C. Em relação ao comportamento térmico do limoneno, observa-se no apêndice A (Figura 3), que este obteve temperatura de pico de 125,41°C, cujo valor foi obtido entre as temperaturas *onset* 84,37°C e *endset* 146,25°C.

Analisando as curvas apresentadas no apêndice A (Figura 4) observa-se que o TG do OEPa apresentou um perda de massa de 102,19% na faixa de temperatura de 31,46 a 212,15°C, em uma única etapa. O carvacrol apresentou na faixa de temperatura de 85 a 200°C uma perda de massa de 100,67%.

O OEPa, mostrou uma curva de DTA com temperatura *onset* 73,02°C e *endset* 199,78°C, com temperatura de pico de 168,20°C. O carvacrol demonstrou uma temperatura *onset* 138,40 e *endset* 199,98°C, com temperatura de pico de 182,93°C.

Ao comparar os parâmetros termoanalíticos e os perfis das curvas térmicas (TG/DTA) entre os óleos essenciais (OEs), pode-se observar a seguinte ordem de estabilidade: OEPa > OEst-folha > OEEg > OEst-fruto. O comportamento térmico sugeriu que os óleos essenciais apresentaram diferentes qualidades físico-químicas, cujos resultados podem ser utilizados para a certificação de óleos essenciais, garantindo um padrão de qualidade elevado e evitando possíveis adulterações, como também, na otimização de obtenção dos mesmos.

4.3.2 Cinética de Evaporação

4.3.2.1 Estudos Cinéticos pelo método de Ozawa

O modelo utilizado para o cálculo dos parâmetros cinéticos foi Ozawa (KOGA, 2013), através das curvas TG dinâmicas. Os parâmetros determinados foram ordem de reação (n), fator de frequência (A) e energia de ativação (E_a) (GIRON, 2002; HAINES, 2012). A energia de ativação é a barreira energética necessária para converter reagentes em produtos e pode ser determinada a partir dos gráficos de Arrhenius (\log da razão de aquecimento versus $1/T$), para diferentes razões de aquecimento. O fator frequência (A) fornece a medida de frequência de ocorrência de uma situação da reação. A ordem da reação (n) é definida como a variação da velocidade da reação com a concentração dos reagentes (OZAWA, 1965). Para aplicação desse método é necessário a obtenção de pelo menos 3 curvas TG sob diferentes razões de aquecimento. Neste trabalho obteve-se 3 curvas TG nas razões de aquecimento 10° , 20° e $40^\circ\text{C.min}^{-1}$. Os dados obtidos dos OEs e marcadores estão apresentados na Tabela 6.

Os dados cinéticos obtidos dos óleos essenciais (OE) e marcadores apresentaram um processo cinético de ordem zero, o que evidencia a possível perda de massa acentuada devido o processo de volatilização. Segundo Oliveira e Cremasco (2014), a análise termogravimétrica do óleo essencial de *Lippia gracilis Schum* exibiu um estágio simples de evaporação que pode ser observado através do aumento da taxa de perda de massa, para um valor máximo que diminui abruptamente. Esta diminuição abrupta pode ser atribuída à evaporação, indicando que o processo é de ordem zero.

Dessa forma, foi possível determinar a pressão de vapor dos óleos essenciais em estudo, pois só é possível determinar a pressão de vapor se a ordem de reação for zero (MARTINS, SBAITE *et al.*, 2011). Conforme estudos realizados por Neto (2010), a cinética de ordem zero ocorre quando a perda de massa independe da concentração do reagente.

O OEPA apresentou uma maior energia de ativação quando comparado com os demais OEs. Os parâmetros cinéticos também mostraram que o OEPA apresentou melhor estabilidade térmica do que os demais OEs. Para os OEs foi obtida a seguinte ordem

decrecente de estabilidade: OEPa > OEst-folha > OEEg > OEst-fruto. Em relação aos marcadores foi obtida a seguinte ordem de estabilidade CAR > LIM > CIN > PIN. O marcador carvacrol, que é o constituinte majoritário do OEPa, apresentou a maior energia de ativação em relação aos marcadores dos outros óleos. Dessa forma, pode-se observar que as características termoanalíticas dos marcadores refletem nas características dos OEs.

Tabela 6- Parâmetros Cinéticos de Ozawa: ordem de reação (n), fator de frequência (A) e energia de ativação (Ea) de dados termogravimétricos dinâmicos.

Amostras	Ordem de reação (n)	A (min^{-1})	Ea (kJ/mol)
OEEg	0	$9,340 \times 10^3$	33,18
1,8-cineol	0	$1,637 \times 10^5$	44,45
OEst fruto	0	$1,515 \times 10^3$	25,46
α-pineno	0	$1,986 \times 10^4$	32,55
OEst folha	0	$1,650 \times 10^5$	44,55
limoneno	0	$3,071 \times 10^5$	45,55
OEPa	0	$7,116 \times 10^4$	46,55
carvacrol	0	$2,273 \times 10^6$	69,16

Fonte: Dados da pesquisa

4.3.3 Pressão de Vapor

A análise termogravimétrica (TG) tem sido uma ferramenta útil para determinar parâmetro de pressão de vapor, por ser uma técnica de rápida avaliação e requerer pequena quantidade de amostra (LIMA, 2012).

A partir dos dados termogravimétricos foi obtida a pressão de vapor dos OEs e seus respectivos marcadores (Tabela 7).

Na razão de aquecimento $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, a pressão de vapor dos óleos essenciais apresentou a seguinte ordem: OEPa > OEEg > OEst-fruto > OEst-folha. Na razão de $20^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ a pressão de vapor apresentou a seguinte ordem: OEPa > OEst-folha > OEst-fruto > OEEg. Para a razão de $40^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ obteve-se a ordem OEPa > OEst-folha > OEEg > OEst-fruto. O OEPa apresentou os maiores valores para pressão de vapor em todas as

razões de aquecimento sendo o óleo de menor estabilidade térmica, pois apresentou uma volatilização maior que os demais óleos. O OEst - folha apresentou uma maior estabilidade térmica na razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ frente aos demais óleos por apresentar uma menor pressão de vapor. O OEEg na razão de $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e o OEst-fruto na razão de $40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ mostraram-se ser mais estável termicamente devido a baixa pressão de vapor. Dessa forma, pode-se observar também que o OEPa foi o único óleo essencial que não sofreu influencia das razões de aquecimento no processo de vaporização.

Obteve-se a pressão de vapor para os marcadores dos respectivos óleos essenciais a partir dos dados termogravimétricos (Tabela 7). Na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, a pressão de vapor apresentou na seguinte ordem decrescente: $\text{CAR} > \text{CIN} > \text{PIN} > \text{LIM}$. Na razão de $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ a pressão de vapor apresentou a seguinte ordem: $\text{CAR} > \text{CIN} > \text{LIM} > \text{PIN}$. Para a razão de $40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ obteve-se a ordem $\text{CAR} > \text{CIN} > \text{LIM} > \text{PIN}$. O CAR demonstrou possuir os maiores valores para pressão de vapor em todas as razões de aquecimento sendo o marcador de menor estabilidade térmica, pois apresenta uma volatilização maior que os demais. O LIM apresentou uma maior estabilidade térmica na razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ frente aos demais marcadores por apresentar uma menor pressão de vapor. O PIN na razão de $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e $40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ mostrou ser mais estável termicamente devido à baixa pressão de vapor. Dessa forma, pode-se observar que as características e/ou estabilidade termoanalíticas dos marcadores refletiram nas características dos OEs. Segundo Hazra, Alexander e colaboradores (2004), a taxa máxima de perda de massa são quase as mesmas no pico devido às substâncias evaporarem em diferentes gamas de temperaturas. Além disso, os OEs e seus marcadores enquadraram-se na classificação de categorias de acordo com (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004).

Tabela 7- Dados de pressão de vapor dos OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa, 1,8-cineol (CIN), α -pineno (PIN), limoneno (LIM) e carvacrol (CAR), nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 °C.min⁻¹, em atmosfera de ar sintético (50 °C.min⁻¹) (n=3).

Amostras	Pressão de Vapor		
	Razão de Aquecimento		
	10 °C.min ⁻¹	20 °C.min ⁻¹	40 °C.min ⁻¹
OEEg	72288,61	16058,11	13819,04
1,8-cineol	67358,77	19758,83	14217,47
OEst fruto	35617,97	16766,57	13108,38
α-pineno	62945,41	15189,72	13466,95
OEst folha	33032,42	21564,72	16612,81
limoneno	38915,30	17100,69	14164,88
OEPa	74828,35	29778,25	18834,75
carvacrol	71859,95	21602,57	18265,56

Fonte: Dados da pesquisa

4.4 CONCLUSÃO

Através da caracterização física, química e físico-química dos derivados vegetais (óleos essenciais), foi possível determinar os parâmetros de controle de qualidade condizentes com as exigências da ANVISA, segundo a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, e dados obtidos da literatura científica.

A caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) possibilitou identificar componentes presentes nos óleos essenciais, como também, permitiu determinar os constituintes majoritários.

As técnicas termoanalíticas (TG e DTA) utilizadas para a caracterização térmica dos óleos essenciais proporcionaram a obtenção de parâmetros tecnológicos em controle de qualidade, fornecendo dados relevantes acerca do perfil térmico e da estabilidade térmica dos óleos essenciais e de seus respectivos marcadores.

Capítulo II

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas
emulsionados contendo óleos essenciais de
Eucaliptus globulus, *Schinus terebinthifolius* e
*Plectranthus amboinicus***

5.CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* E *Plectranthus amboinicus*

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Preparações das Emulsões

As emulsões O/A foram preparadas utilizando misturas de diferentes proporções de agentes tensoativos de natureza lipofílica (Span[®] 80, EHL= 4,3) e outro de natureza hidrofílica (Tween[®] 20, EHL= 16,7) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Valores do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) das emulsões contendo óleo essencial.

Formulação	TWEEN 20 [®]		SPAN 80 [®]		Valor EHL Final
	(%)	EHL	(%)	EHL	
F1	100.0	16.7	0.0	0.0	16.7
F2	91.9	15.4	8.1	0.3	15.7
F3	83.9	14.0	16.1	0.7	14.7
F4	75.8	12.7	24.2	1.0	13.7
F5	67.7	11.3	32.3	1.4	12.7
F6	59.7	10.0	40.3	1.7	11.7
F7	51.6	8.6	48.4	2.1	10.7
F8	43.5	7.3	56.5	2.4	9.7
F9	35.5	5.9	64.5	2.8	8.7
F10	27.4	4.6	72.6	3.1	7.7
F11	19.4	3.2	80.6	3.5	6.7
F12	11.3	1.9	88.7	3.8	5.7
F13	3.2	0.5	96.8	4.2	4.7
F14	0.0	0.0	100.0	4.3	4.3

F- Formulação, EHL-Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

Fonte: FERREIRA, 2010.

As emulsões foram obtidas pelo método da temperatura de inversão de fase o qual foram preparadas 100 mL de emulsão O/A, contendo 5% (p/p) de um óleo (5g), 2% (p/p) de tensoativos (2g) e 93% (p/p) de água (93 mL) (FERREIRA, SANTIAGO *et al.*, 2010). Inicialmente, a fase dispersante foi preparada pela adição de Tween 20[®] em água destilada. Além disso, a fase dispersa foi obtida com a adição de Span 80[®] no óleo essencial. Ambas as fases foram aquecidas separadamente a 50°C, e em seguida, misturadas. As emulsões finais foram obtidas após a homogeneização utilizando um ultra-turrax[®] (IKA, modelo T-18, Frankfurt, Germany) a 15.500 rpm, durante 10min.

5.1.2 Estabilidade a Curto Prazo

A estabilidade a curto prazo foi avaliada por meio da técnica de microhematócrito (TME) conforme descrito por MACEDO (2006). Para tanto, tubos capilares com heparina livre foram cheios até 75%, com cada formulação e colocada numa microcentrífuga Quimis (modelo Q 10.500, São Paulo, Brasil) a 10.500 rpm, durante 10 min. Após o ciclo de centrifugação, os tubos capilares foram colocados contra a escala do microhematócrito e as preparações que não separaram de fase, o creme foi medido diretamente. O aspecto visual foi avaliado a fim de investigar a separação de fases.

5.1.3 Estabilidade a Longo Prazo

As amostras foram armazenadas em tubos de ensaios sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Durante o período de armazenamento foram analisadas o pH, condutividade e índice de cremagem (IC). Além disso, foram avaliadas o índice de cremagem (IC) das amostras armazenadas, em tubos de ensaios, a baixa temperatura ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) no período de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias (FERREIRA, SANTIAGO *et al.*, 2010).

5.1.3.1 Índice de Cremagem

O Índice de Cremagem (IC) foi determinado experimentalmente por meio de um paquímetro digital realizando as medições do creme formado na superfície. Os valores de IC foram obtidos pela razão entre a altura total do creme (CC) e a altura total da emulsão (CT) de acordo com a eq. 5 (FERREIRA, SANTIAGO *et al.*, 2010). CC e CT foram medidos direto em tubos de ensaios de armazenamento com a ajuda de uma escala graduada.

$$\% IC = \left(\frac{CC}{CT} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde CC= altura total do creme e CT= altura total da emulsão.

5.1.3.2 Avaliação do pH

As medições pH das emulsões foram realizadas utilizando um phmetro digital Cap-Lab[®] (modelo PG1800, São Paulo, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a temperatura de $25^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

5.1.3.3 Avaliação de Condutividade

A condutividade foi determinada usando um condutivímetro portátil MITE[®] (modelo CD30, São Paulo, Brasil) previamente calibrado com uma solução padrão de 0,1N KCl à temperatura de 25°C .

5.1.4 Quantificação dos Marcadores

O principal componente de cada óleo essencial analisado foi quantificado por um cromatógrafo de gás Shimadzu[®] (modelo GC-2010 Plus, Kyoto, Japan), detector por ionização em chama (DIC), equipado com um injetor *split/split less* AOC-20i e um amostrador automático. As análises foram realizadas sob as seguintes condições: 1,0μL de

volume de injeção, modo de separação, a partir da temperatura da coluna 60°C, velocidade de 10°C.min⁻¹ até 200°C, a taxa de 20°C.min⁻¹ até 280°C. Temperatura do injetor foi de 260°C e detector a 280°C. Na extração do óleo essencial da emulsão o solvente utilizado foi etanol.

5.1.5 Diagrama de Fases

A fim de determinar a região de concentração dos componentes das formulações capazes de formar emulsões, foram construídos diagramas de fases utilizando o método de diluição de água à temperatura ambiente (FERREIRA *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2012).

A construção dos diagramas de fases pseudoternários foi a partir da combinação dos tensoativos monolaurato de sorbitano (Tween 20[®]) e oleato de sorbitano (Span 80[®]), óleo essencial fase oleosa e fase aquosa composta por água. Os óleos essenciais utilizados foram *E. globulus* (folha) e *S. terebinthifolius* (folhas e fruto). A preparação do diagrama pseudoternário foi elaborada a partir da mistura de tensoativo e fase oleosa, com a titulação subsequente com a fase aquosa, cuja variação de concentração nas seguintes proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 permitiu a realização de 99 formulações. A homogeneização foi realizada em ultra-turrax[®] (IKA, modelo T-18, Frankfurt, Germany) com agitação mantida durante o período de 10 min. As emulsões foram avaliadas macroscopicamente, de acordo com a consistência, a fim de classificar os sistemas de acordo com os seus aspectos físico-químicos em microemulsão, emulsão, creme, loção ou separação de fases.

5.1.6 Estudos Termoanalíticos

5.1.6.1 Estudos Termogravimétricos (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas TG e DTA dos óleos essenciais foram obtidos utilizando uma termobalança Shimadzu[®], modelo DTG-60H, sob ar sintético, de fluxo de 50 mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10, 20 e 40°C.min⁻¹, de 25 a 350°C. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina com uma massa de 18,0 mg ($\pm 0,5$). A ordem da

reação (n), o fator de frequência (A) e a energia de ativação (Ea) foram determinados usando o método de Ozawa a partir dos dados da termogravimetria dinâmicas em atmosferas de ar.

A determinação da faixa de temperatura (inicial e final) da etapa determinante, necessária para aplicar o modelo de Ozawa, foi obtida por dois diferentes modelos de coleta de dados: tangente e observando a curva da derivada primeira (KOGA, 2013).

Os dados termogravimétricos e diferenciais térmicos foram analisados usando um software TASYs da Shimadzu®.

5.1.6.2 Pressão de Vapor

5.1.6.2.1 Equação de Antoine e Equação de Langmuir

Os dados obtidos dos experimentos termogravimétricos do metilparabeno foram utilizados para construir as curvas de pressão de vapor, utilizando a equação de Antoine, e posteriormente determinar o valor de k , o qual será utilizado para a construção das curvas de pressão de vapor dos óleos essenciais e seus respectivos marcadores, utilizando a equação de Langmuir (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004).

O valor de k para o metilparabeno na razão de 10, 20 e 40°C.min⁻¹, em atmosfera de ar sintético foram: 125555 ($\pm 1,60$) e 414034 ($\pm 1,50$), respectivamente (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004).

A equação de Antoine (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004) é apresentada como se segue:

$$\ln P = \frac{A - B}{T + C} \quad (2)$$

Onde P : é a pressão de vapor, T é a temperatura absoluta e A , B e C são as constantes de Antoine de um dado intervalo de temperatura. As constantes de Antoine registradas para o metilparabeno são: $A = 5.23662$, $B = 1159.34$ e $C = -220.03$, para um intervalo de temperatura de 446-517 K (KOGA, 2013).

A equação de Langmuir (HAZRA, ALEXANDER *et al.*, 2004) é apresentada como se segue:

$$\frac{dm}{dt} = P \propto \left(\frac{M}{2RT}\right) \quad (3)$$

Onde (dm/dt) : é a razão da perda de massa por unidade de área, P é a pressão de vapor, α é a constante de vaporização e M é a massa molecular do vapor de evaporação.

A equação de Langmuir pode ser modificada para obter os valores de pressão de vapor de vários componentes simples. A seguinte modificação é descrita por Hazra, Alexander e colaboradores (2004):

$$P = \left[\alpha^{-1}(2\pi R)^{\frac{1}{2}}\right] \cdot \left[\left(\frac{T}{M}\right)^{\frac{1}{2}}\left(\frac{dm}{dt}\right)\right] = k \cdot \vartheta \quad (4)$$

Onde: $k = \alpha^{-1} (2\pi R)^{\frac{1}{2}}$ e $\vartheta = \left(\frac{T}{M}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{dm}{dt}\right)$

Se k é considerado uma constante para um dado grupo de dados e é independente do material usado, então o gráfico de P versus ϑ dá o valor de k .

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Estudo de Estabilidade a Curto Prazo

Os resultados observados nos estudos de estabilidade realizados a curto prazo, utilizando a técnica do microhematócrito mostraram uma relação entre os valores de EHL e do índice de cremagem (IC) conforme descrito na Figura 1. Os valores de IC foram obtidos conforme a Equação 1.

A técnica de microhematócrito produz estresse na amostra, forçando o deslocamento e sedimentação das gotículas devido ao aumento na força da gravidade, a fim de observar a presença de creme ou separação de fase (MCCLEMENTS, 2012). Segundo Casagrande e colaboradores (2009), este teste é especialmente utilizado para avaliar a estabilidade de emulsões na fase de pré-formulação, dessa forma, pode ser útil para detectar alterações durante o armazenamento.

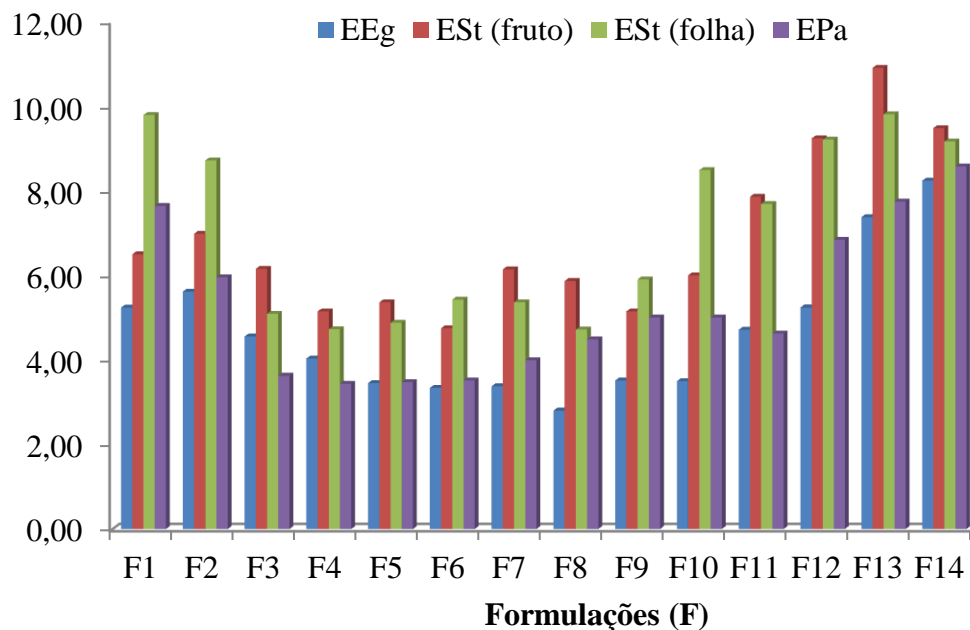
As formulações contendo OEEg demonstraram que F5 (3,34%), F6 (3,33%), F7 (3,37%), F8 (2,80%), F9 (3,51%) e F10 (3,49%) possuíam os menores IC, dentre essas a F8 apresentou o menor IC com um valor de EHL de 9,7.

O microhematócrito apresentou os menores IC para as formulações de OEst fruto F4, F5, F6 e F9 nas seguintes porcentagens: 5,14%, 5,36%, 4,75% e 5,14%.

As emulsões contendo OEst (folha), que apresentaram o menor IC foram as formulações F3 (5,09%), F4 (4,72%), F5(4,88%) e F6 (5,42%), F7 (5,36%), F8 (4,72%) e F9 (5,9%).

Os resultados referente aos IC realizados no estudo de estabilidade a curto prazo das formulações contendo OEPa apresentaram as seguintes formulações com os menores índices de cremagem (IC), foram F3, F4, F5 e F6 com as seguintes porcentagens: 3,62%; 3,43%; 3,47% e 3,51%, respectivamente.

Figura 1- Avaliação do índice de cremagem para o estudo de estabilidade a curto prazo, segundo a técnica microhematócrito, de emulsões contendo óleo essencial de *E. globulus* (EEg), *S. terebinthifolius*-fruto (ESt fruto), *S. terebinthifolius*-folha (ESt folha) e *P. amboinicus* (EPa).



Fonte: Dados da Pesquisa

Os resultados obtidos na Figura 1 sugerem que o método foi capaz de detectar não só a influência da tensão centrífuga, mas também contribuiu com a determinação da faixa de formulações, que apresentaram estabilidade do sistema.

A técnica de microhematócrito foi descrita pela primeira vez por Macedo, Fernandes e colaboradores (2006), como capaz de detectar o EHL correlacionado com o IC de cada sistema emulsionante de forma rápida e eficiente. Além disso, esta técnica pode ser utilizada com sucesso para avaliar os parâmetros de formulação, tais como a composição de tensoativo, bem como o seu respectivo valor de EHL uma vez que acelera o índice de formação de creme ou a sedimentação dos produtos. No entanto, o estudo de estabilidade a curto prazo em nosso trabalho se apresentou como um indicativo da faixa de EHL com melhor estabilidade, diferindo dos resultados apresentados por Macedo, Fernandes e colaboradores (2006), onde a técnica de microhematócrito foi capaz de determinar individualmente a influência do valor de EHL na estabilidade das formulações. Os resultados confirmam a viabilidade do estudo de curto prazo utilizando o microhematócrito,

porém, apenas como teste preliminar para determinar uma faixa menor de EHL a ser avaliado no estudo de longo prazo (FERREIRA, SANTIAGO *et al.* 2010; TADROS, 2014).

5.2.2 Estudo de Estabilidade a Longo Prazo

Os resultados do estudo de estabilidade a longo prazo das emulsões contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa estão expressos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5. O experimento foi realizado durante 180 dias sob condições diferentes de temperatura (5 e 25°C). Dessa maneira, foram avaliados os parâmetros, como índice de cremagem, pH, condutividade e a quantificação dos marcadores de acordo com uma variação dos valores de EHL (FERREIRA, SANTIAGO *et al.*, 2010; TADROS, 2014).

5.2.2.1 Índice de Cremagem

O Índice de Cremagem (IC) é a medida mais habitual da instabilidade da emulsão resultando numa possível separação de fases. No entanto, o índice de cremagem está associado à interface que separa a fase oleosa da fase aquosa e só é possível obter informação sobre a localização da interface entre a fase oleosa e aquosa e não sobre o perfil de concentração total de gotículas (VARKA E KARAPANTSIOS, 2011). O IC pode fornecer informações indiretas sobre o grau de agregação das gotículas na emulsão, quanto maior o índice de formação de creme, mais rapidamente o movimento das gotas e, por conseguinte, a separação de fases (VARKA, AMPATZIDIS *et al.*, 2010, HOSSEINI, JAFARI *et al.*, 2015).

As formulações foram avaliadas após 24 horas de preparadas, durante o período de 180 dias. Embora haja variação dos valores de EHL das formulações de acordo com a Tabela 1, o processo de emulsificação por inversão de fases foi capaz de produzir em todas as emulsões um aspecto branco leitoso. Os valores de IC foram obtidos conforme a equação 1.

As emulsões contendo OEEg, (F8, F9, F10, F11, F12 e F14) no primeiro dia (D1) mostraram visualmente um aspecto homogêneo sem a formação de creme na superfície

para ambas as formulações armazenadas à temperatura ambiente e a temperatura de 5°C, conforme Tabela 2.

As emulsões de OEEg (F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13) à temperatura ambiente, apresentaram uma pequena formação de creme até o décimo dia (D10) de armazenamento, o que indica que as emulsões são estáveis para a separação de fase durante este curto período de armazenamento. Com o aumento do período de armazenamento, foi observada uma formação gradual de creme até o trigésimo dia (D30). As formulações F8, F9 e F10 mostraram cremes constantes a partir do D60. Por outro lado, as emulsões de OEEg armazenadas a 5°C (F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, F13 e F14) mostraram a formação de creme irrelevante até 15 dias (D15) de armazenamento, o que indica que as emulsões são estáveis durante este curto período de armazenamento. Com o aumento do período de armazenamento, observou-se uma formação de creme até D60, mas depois permaneceu constante sem nenhuma alteração.

Observou-se que as formulações F13 e F14 (à temperatura ambiente) e F14 (a 5°C) apresentaram um valor elevado do IC. No entanto, as formulações F7 a F12 (temperatura ambiente) e F5 a F8 (temperatura de 5°C) tiveram os menores IC, demonstrando serem as emulsões mais estáveis. Destas formulações, a F7 e F8 armazenadas tanto à temperatura ambiente, quanto à temperatura de 5°C, apresentaram uma menor variação no IC durante o período de 180 dias (D180) de armazenamento, demonstrando serem as mais estáveis.

Tabela 2- Índice de cremagem (%) em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de *E. globulus* (EEg).

Formulações	EHL	Tempo de Armazenamento (D - dia)																			
		D1		D3		D10		D15		D30		D60		D90		D120		D150		D180	
		25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
F1	16,7	3,51	1,74	3,54	3,48	4,42	4,35	4,55	4,39	3,74	4,46	0,00	5,45	0,00	4,59	0,00	4,67	0,00	4,81	0,00	3,92
F2	15,7	2,94	1,87	2,94	2,80	3,92	3,74	3,88	3,81	2,97	3,81	1,05	4,81	0,00	5,88	0,00	4,95	0,00	4,08	0,00	4,17
F3	14,7	2,78	1,98	2,78	1,98	3,70	2,97	3,85	4,04	2,97	4,08	1,05	5,21	1,11	5,26	1,15	5,32	0,00	4,40	0,00	5,56
F4	13,7	1,85	1,89	2,78	1,89	2,78	2,83	2,86	2,86	2,94	3,88	1,04	4,90	1,11	4,95	1,15	4,00	0,00	4,12	0,00	4,12
F5	12,7	2,94	2,00	2,94	2,00	3,00	3,00	3,06	3,06	2,11	3,09	2,27	4,21	1,22	4,26	1,28	3,23	1,37	4,40	0,00	3,33
F6	11,7	1,96	1,02	1,96	1,02	1,96	2,04	2,04	2,08	2,08	2,11	1,11	3,23	1,19	3,26	1,23	3,33	1,41	3,41	1,39	3,45
F7	10,7	1,94	1,01	1,94	1,01	1,94	2,02	2,00	2,04	2,06	2,08	1,11	4,21	1,19	4,26	3,75	3,33	1,25	3,33	0,00	3,37
F8	9,7	0,00	0,00	0,93	0,00	1,85	1,04	1,92	1,06	0,98	2,13	0,00	2,17	0,00	3,30	0,00	3,26	0,00	3,41	0,00	3,53
F9	8,7	0,00	0,00	0,97	0,00	1,94	1,11	2,02	1,12	1,04	2,25	0,00	2,27	0,00	3,49	0,00	3,53	0,00	3,61	0,00	5,00
F10	7,7	0,00	0,00	0,93	0,00	1,85	1,02	1,92	1,02	0,99	2,06	0,00	3,13	0,00	3,16	0,00	4,26	0,00	4,35	0,00	5,56
F11	6,7	0,00	0,00	0,93	0,97	1,85	1,94	1,90	1,96	1,96	1,98	3,06	3,00	1,09	4,08	3,41	4,12	2,38	4,26	1,27	5,38
F12	5,7	0,00	0,00	0,93	0,00	1,85	1,00	1,90	2,04	1,94	2,06	4,12	3,09	4,35	4,17	5,75	5,38	3,66	5,56	1,30	6,74
F13	4,7	0,91	0,00	1,82	0,00	2,73	0,88	2,75	1,79	4,76	3,64	6,00	5,45	6,32	7,41	8,89	7,84	9,41	7,69	11,25	6,80
F14	4,3	0,00	0,00	2,73	0,93	3,64	0,93	3,70	1,87	5,71	3,77	6,93	5,71	7,45	6,80	8,89	8,82	10,59	10,00	11,11	10,20

F- formulações, D - dias.

Fonte: Dados da Pesquisa

As formulações F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11 e F12, contendo OEst (fruto), à temperatura ambiente (Tabela 3) apresentaram, no tempo D1, os menores valores de IC, já nos dias D30 e D90, as formulações que apresentaram os menores valores de IC foram F5, F6, F7, F8 e F9. A emulsão F14 apresentou uma instabilidade elevada culminando na separação de fase no tempo D30, devido à elevada formação de creme. Além disso, as formulações F4, F5, F6 e F7 mostraram possuir os menores IC e uma menor variação do IC ao longo do período de 180 dias.

As emulsões, contendo OEst (fruto), armazenadas à temperatura 5°C, conforme Tabela 3, demonstraram possuir IC reduzidos nos primeiros 10 dias (D10). As formulações F5, F6, F7, F8, F9 e F10 apresentaram os menores IC no tempo D30, D90 e D120. No entanto, no tempo D180 as emulsões F5, F6 e F7 mostraram os menores IC e as menores variações do IC. As formulações que apresentaram um menor IC ao longo de 180 dias (D180) de armazenamento foram F5, F6 e F7, em ambas as temperaturas.

Na avaliação do IC das emulsões contendo OEst (folha), no tempo D1, não houve a formação de creme para as formulações F8, F9, F10 e F11 para ambas as temperaturas de armazenamento (Tabela 4). Nas formulações F1 e F2, no tempo D150, e na F3 no tempo D180, verificou-se a separação de fases, tal fenômeno ocorreu devido ao aumento progressivo e acentuado da formação de creme, que levou à coalescência promovendo a separação de fase e consequentemente a perda da estabilidade (LIZARRAGA, PAN *et al.*, 2008; XAVIER-JÚNIOR, SILVA *et al.*, 2012; KOMAIKO, SASTROSUBROTO *et al.*, 2015).

Além disso, as formulações F8 e F9 a partir de D30 até D180 para a temperatura ambiente e a temperatura de 5°C (Tabela 4) apresentaram os menores valores e menores variações de IC. Dessa forma, foi constatado que as formulações OEst (folha) F8 e F9 foram as mais estáveis, uma vez que, o fenômeno de formação de creme não foi tão acentuado como nas outras formulações. É necessário um segundo experimento fracionando os valores de EHL entre as formulações F8 e F9 para determinar de forma mais precisa a emulsão com a melhor estabilidade.

Tabela 3- Índice de cremagem (%) em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de *S. Terebinthifolius-fruto* (ESt-fruto).

		Tempo de Armazenamento (D - dia)																			
Formulação	EHL	D1		D3		D10		D15		D30		D60		D90		D120		D150		D180	
		25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
F1	16,7	4,76	3,53	6,02	4,71	7,23	7,06	8,43	7,06	8,54	8,24	7,32	7,14	7,41	8,33	6,25	8,33	6,25	8,33	6,33	8,33
F2	15,7	3,26	3,26	5,43	4,35	6,52	5,43	6,59	6,52	7,69	7,61	7,78	6,59	6,74	7,69	7,87	7,78	6,82	8,89	6,82	7,78
F3	14,7	3,06	2,30	4,08	3,45	5,10	5,75	6,19	5,75	6,19	6,90	6,25	6,98	6,32	6,98	7,37	6,98	7,37	8,14	6,38	8,24
F4	13,7	3,37	2,22	4,49	3,37	5,68	5,62	5,68	5,62	6,82	6,74	6,90	6,74	6,98	6,82	6,98	6,82	5,88	6,82	4,71	6,82
F5	12,7	1,94	1,06	2,94	3,19	4,90	4,26	4,95	5,32	4,95	5,26	5,94	6,45	6,00	6,38	6,00	5,38	6,06	6,45	5,05	5,38
F6	11,7	2,06	1,04	3,09	2,08	4,12	4,17	4,17	4,17	5,21	4,17	5,26	5,26	5,26	5,26	5,26	5,26	5,26	5,26	5,32	5,26
F7	10,7	0,99	1,00	1,98	2,00	3,96	3,00	4,00	3,00	4,00	4,04	5,00	5,05	5,05	5,10	5,05	5,10	6,06	5,10	6,06	5,10
F8	9,7	1,11	0,00	2,22	1,03	3,33	3,09	3,33	3,09	4,44	4,17	5,62	5,21	5,68	5,21	5,68	5,21	7,95	6,25	6,90	6,25
F9	8,7	0,97	0,00	1,94	0,97	2,91	1,94	2,91	2,91	3,92	3,88	3,96	4,90	4,95	5,88	6,00	6,86	7,00	7,84	7,00	5,88
F10	7,7	1,02	0,00	1,02	1,04	4,12	3,13	5,15	3,13	6,19	4,17	7,22	5,26	8,25	6,32	9,28	6,32	8,33	7,37	9,38	7,37
F11	6,7	0,97	0,99	1,94	0,99	4,85	3,96	5,88	3,96	6,86	5,00	7,84	8,00	8,82	8,00	10,89	9,00	10,89	9,00	12,87	12,00
F12	5,7	2,00	1,08	3,00	2,15	7,00	4,30	8,00	6,45	10,00	7,53	10,00	9,68	10,10	10,87	12,12	11,96	12,24	11,96	12,24	10,87
F13	4,7	1,96	2,02	3,96	3,03	8,91	6,12	10,00	7,14	12,00	9,18	12,00	11,22	11,11	13,27	14,14	13,40	13,00	13,40	15,15	14,43
F14	4,3	2,15	0,00	3,23	2,91	8,60	5,83	9,78	7,77	SF	8,74	SF	10,78	SF	12,75	SF	12,75	SF	13,86	SF	14,85

F- formulações, D - dias.

Fonte: Dados da Pesquisa

Tabela 4. Índice de cremagem (%) em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de *S. Terebinthifolius-folha* (ESt-folha).

Tempo de Armazenamento (D - dia)																					
Formulações	EHL	D1		D3		D10		D15		D30		D60		D90		D120		D150		D180	
		25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
F1	16,7	3,61	1,89	4,88	3,77	7,41	5,71	6,25	6,67	6,33	7,62	6,49	7,77	13,33	7,77	13,70	8,91	SF	7,84	SF	7,92
F2	15,7	2,50	2,33	5,00	3,49	6,41	5,81	6,41	5,88	7,79	7,06	6,76	8,24	9,72	8,33	10,00	8,43	SF	9,64	SF	8,54
F3	14,7	3,09	2,02	3,09	3,03	5,26	5,62	5,26	6,06	5,32	6,12	5,56	7,29	5,62	8,33	4,65	7,29	35,29	7,29	SF	7,37
F4	13,7	2,25	1,94	3,37	2,94	5,75	4,90	5,81	4,90	5,81	5,88	6,10	7,00	4,94	7,00	6,25	7,00	5,13	7,07	5,33	7,14
F5	12,7	2,33	2,17	3,49	3,26	4,71	4,35	4,71	4,35	5,95	5,43	4,94	6,59	6,33	6,67	6,49	6,67	5,71	5,56	5,80	6,82
F6	11,7	2,27	2,47	3,45	2,47	4,60	4,94	4,65	4,94	5,88	5,00	4,88	6,25	6,17	6,25	6,33	6,33	6,49	6,33	4,00	7,69
F7	10,7	1,15	1,11	2,30	2,22	4,65	3,33	4,71	4,44	4,76	4,44	6,17	5,62	6,25	5,68	5,13	5,68	3,95	6,82	8,00	6,82
F8	9,7	0,00	0,00	0,00	1,19	1,20	2,38	1,22	2,38	1,25	3,61	1,30	2,44	1,33	3,66	1,35	3,70	1,39	5,00	1,43	6,25
F9	8,7	0,00	0,00	1,10	1,09	1,11	2,17	2,27	3,30	1,15	3,30	1,20	3,33	1,25	4,44	1,27	5,56	1,28	5,62	1,32	5,62
F10	7,7	0,00	0,00	1,11	1,14	3,37	2,27	3,41	3,41	4,60	4,60	3,57	4,60	6,10	5,81	6,25	5,81	5,06	8,24	6,49	8,24
F11	6,7	0,00	0,00	1,06	1,06	2,13	2,13	3,19	3,19	4,35	4,26	5,56	4,30	5,56	5,38	5,68	6,45	5,75	6,52	5,81	7,61
F12	5,7	1,04	2,13	2,08	2,13	4,21	4,26	5,26	4,26	6,38	5,38	6,45	6,45	6,59	8,60	5,56	9,78	9,09	7,61	11,49	7,61
F13	4,7	1,90	0,96	2,86	1,92	5,77	2,88	6,73	4,81	7,77	6,80	7,84	7,84	5,00	0,98	5,05	9,90	10,20	10,89	12,37	12,00
F14	4,3	1,85	1,83	2,78	2,78	4,63	3,70	6,48	4,63	6,60	5,56	6,73	6,48	8,74	10,28	9,90	10,78	13,00	11,88	15,46	14,85

F- formulações, D - dias.

Fonte: Dados da Pesquisa

A Tabela 5 mostra que todas as formulações contendo OEPA à temperatura ambiente apresentaram formação de creme a partir do primeiro dia (D1). Com o aumento do período de armazenamento, as emulsões mostram gradual formação de creme até os 90 dias (D90). As emulsões F5, F6, F7, F8, F9, F10 e F11 separaram de fase aos 120 dias (D120). Por conseguinte, as emulsões F12 e F13 separaram de fase aos 180 dias (D180) demonstrando a instabilidade do sistema. A formulação F14 apresentou uma elevada formação de creme no D180. Durante o processo de formação de creme, observou-se inicialmente um elevado IC, e, em seguida, o aumento progressivo do IC e uma diminuição, ao longo do tempo, de armazenamento no qual a emulsão está se preparando para a separação de fase (LIZARRAGA, PAN *et al.*, 2008; KOMAIKO, SASTROSUBROTO *et al.*, 2015). Por outro lado, as emulsões F1, F2, F3 e F4 apresentaram uma melhor estabilidade em relação às outras emulsões.

As formulações OEPA, analisadas à temperatura 5°C (Tabela 5), apresentaram ser mais estáveis que as formulações armazenadas à temperatura ambiente, não sendo observada separação de fase até o D180 (GHOSH, PRADHAN *et al.*, 2015). Ao comparar as formulações à temperatura ambiente e 5°C, observou-se que há influência da temperatura sobre a estabilidade (VARKA, AMPATZIDIS *et al.*, 2010). De acordo com estudos realizados por Leal, Sousa *et al.* (2013) e Hosseini, Jafari *et al.* (2015), as altas temperaturas promovem uma elevada frequência de colisões das gotículas acelerando o processo de coalescência, resultando em uma menor estabilidade das emulsões.

Com o aumento do período de armazenamento, houve o aumento contínuo de creme presente nas formulações no qual observou os maiores IC nas formulações F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 e F13. No entanto, as emulsões F1, F2, F3, F4 e F5 apresentaram os menores IC a 5°C. Dessa forma, as formulações mais estáveis na avaliação do IC, tanto à temperatura ambiente quanto à temperatura de 5°C foram as formulações F1, F2, F3 e F4.

Tabela 5- Índice de cremagem (%) em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (5°C) para emulsões contendo óleo volátil de *P.amboinicus* (EPa).

Tempo de Armazenamento (D - dia)																					
Formulação	EHL	D1		D3		D10		D15		D30		D60		D90		D120		D150		D180	
		25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
F1	16,7	2,44	2,44	3,66	3,70	6,17	3,70	6,25	3,75	6,25	5,00	6,41	5,06	6,67	5,13	6,85	6,41	5,71	6,41	5,80	6,41
F2	15,7	2,41	3,61	5,06	4,82	6,41	3,66	6,58	3,70	6,58	4,94	6,85	5,00	7,14	6,25	8,82	6,25	7,69	5,06	8,20	5,06
F3	14,7	5,00	3,75	5,00	6,25	7,69	5,00	7,89	3,85	7,89	5,13	8,11	6,41	7,14	6,41	7,25	7,69	7,58	6,49	6,25	7,79
F4	13,7	5,13	3,75	6,41	5,06	6,41	5,06	6,58	5,13	6,58	5,13	8,00	6,49	6,85	6,49	6,94	6,58	7,25	6,58	7,46	6,67
F5	12,7	5,13	4,88	6,41	4,88	6,58	4,94	6,76	5,00	6,76	6,25	8,45	6,33	5,97	6,33	SF	7,59	SF	7,69	SF	7,69
F6	11,7	4,88	5,00	6,10	6,25	7,41	6,33	7,59	6,41	7,59	6,41	9,09	7,79	5,41	7,89	SF	7,89	SF	7,89	SF	8,00
F7	10,7	3,90	3,75	5,19	5,00	6,67	6,25	6,76	5,06	6,76	6,33	8,22	7,69	5,71	7,79	SF	7,79	SF	7,79	SF	9,09
F8	9,7	5,00	3,85	6,25	5,19	7,50	6,49	7,79	5,19	7,79	6,49	9,21	7,89	6,85	7,89	SF	8,00	SF	8,11	SF	9,46
F9	8,7	5,13	4,94	5,13	5,00	6,41	6,25	7,89	5,06	7,89	6,33	6,67	7,59	6,94	8,97	SF	7,69	SF	8,97	SF	10,26
F10	7,7	3,75	2,56	5,00	3,85	6,49	6,41	8,82	5,19	8,82	6,49	10,17	6,58	8,93	8,00	SF	8,00	SF	8,11	SF	9,46
F11	6,7	3,75	3,70	5,00	4,94	7,59	7,41	7,79	6,25	7,79	7,59	9,21	8,86	8,11	8,97	SF	10,39	SF	9,09	SF	10,39
F12	5,7	3,75	2,50	5,00	5,00	8,86	6,25	7,79	5,06	7,79	6,33	6,67	8,97	9,46	9,09	9,86	7,79	0,00	9,21	SF	9,21
F13	4,7	1,23	1,25	2,47	3,75	6,25	5,00	6,41	5,06	6,41	6,33	9,33	7,69	10,96	8,97	9,86	8,97	8,82	9,09	SF	11,84
F14	4,3	2,50	3,80	3,80	3,85	6,41	5,06	7,89	5,13	7,89	6,41	8,22	9,09	11,43	9,09	11,94	10,53	7,81	10,53	13,11	12,00

F- formulações, D - dias.

Fonte: Dados da Pesquisa

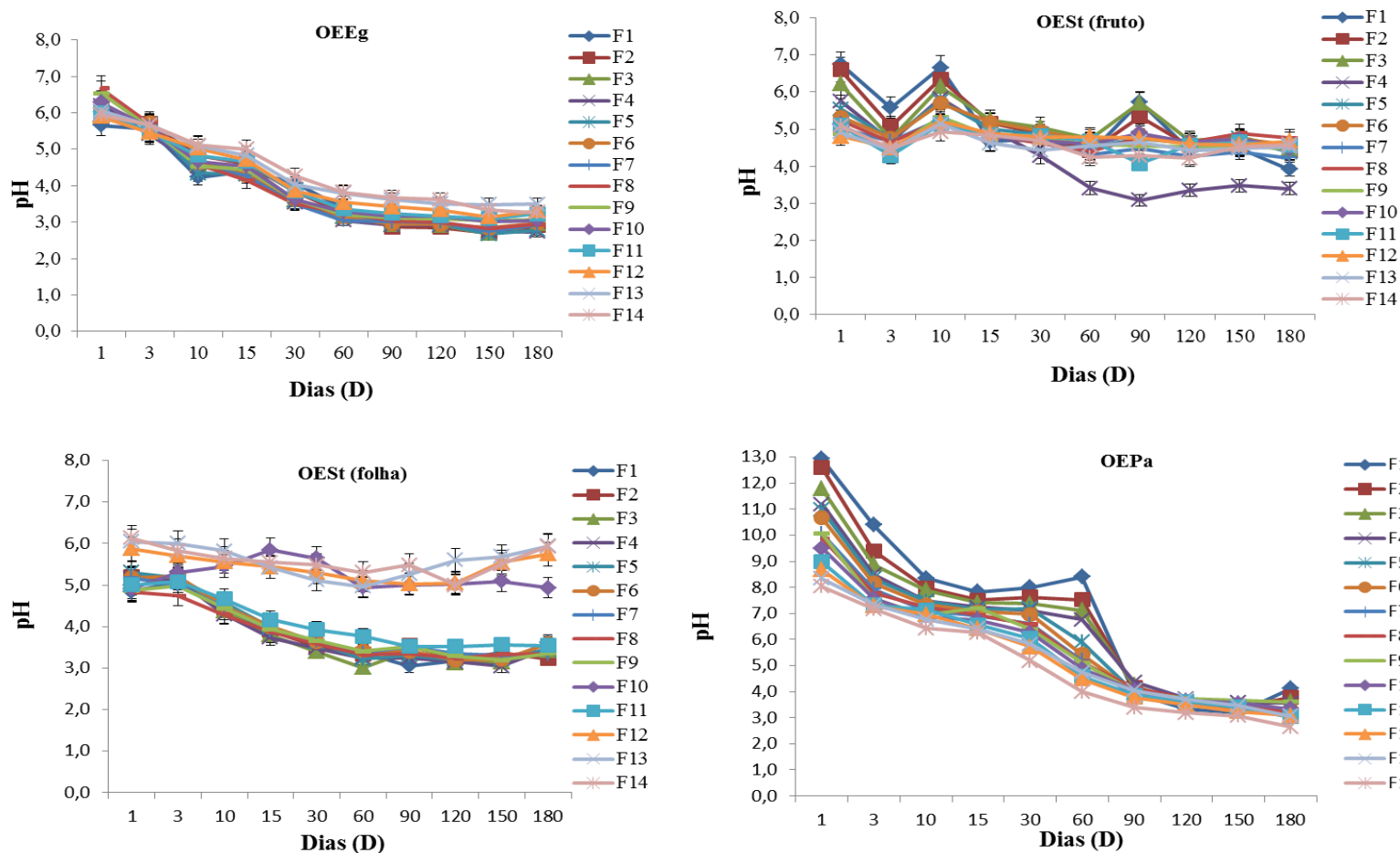
Dessa forma, após a emulsificação, foi constatado que, em todas as emulsões contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa, as gotículas migraram para a superfície da amostra e, após de algumas horas, começaram a formar uma camada de creme, que resultou na agregação destas gotículas facilitando a coalescência podendo eventualmente separar de fase (KOMAIKO, SASTROSUBROTO *et al.*, 2015; GUERRA-ROSAS, MORALES-CASTRO *et al.*, 2016). Assim, as emulsões mostraram comportamento diferente para formação de creme durante o tempo de armazenamento, de acordo com a concentração do agente tensoativo utilizado.

5.2.3 pH

O valor de pH é uma ferramenta simples, que permite avaliar os processos de instabilidade, uma vez que uma diminuição significativa deste parâmetro demonstra uma possível degradação de sistemas emulsionados (FERREIRA *et al.*, 2010; XAVIER-JÚNIOR, SILVA *et al.* 2012; CHEN *et al.*, 2013). Os resultados de pH para os sistemas emulsionados contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa armazenados à temperatura ambiente, estão apresentados na Figura 2.

As emulsões OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa demonstraram uma tendência de diminuição ao longo de 180 dias, dos valores de pH na mesma formulação. Além disso, a formulação F4 contendo OEst (fruto) apresentou a maior redução de pH, a partir do décimo quinto dia (D15), quando comparado com as formulações contendo o mesmo óleo essencial. Apesar do IC (temperatura ambiente/ temperatura 5°C) não detectar uma instabilidade acentuada na formulação F4 ao longo dos 180 dias, o valor de pH da referida formulação já demonstrava a ocorrência de degradação da formulação F4 a partir do tempo D15. As formulações F10, F11, F12, F13 e F14 contendo OEst (folha) não apresentaram uma redução acentuada do pH, tal fato ocorreu, segundo Macedo *et al.* (2006), em função da quantidade elevada de Span[®] 80.

Figura 2 - Determinação de pH durante estudo de estabilidade (1 a 180 dias) de emulsões preparadas com os óleos essenciais de *E. globulus* (OEEg), *S. Terebinthifolius-fruto* (OEST fruto), *S. Terebinthifolius-folha* (OEST folha) e *P. amboinicus* (OEPa).



Fonte: Dados da Pesquisa

Segundo Ferreira, Santiago (2010) e Chen, Zhao e colaboradores (2013), a redução dos valores de pH pode ser explicada pela decomposição dos óleos voláteis em razão da ocorrência das reações de hidrólise, causando uma diminuição do pH em função do tempo de armazenamento e não uma instabilidade física. Cabe salientar que, em óleos voláteis, a oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo que pode ocorrer em função do processamento e das condições de armazenamento, promovendo alterações de parâmetros físico-químicos (AZEEZ, EJETA *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados de pH para emulsões armazenadas à temperatura ambiente não indicaram uma influência importante sobre o EHL, uma vez que, o pH não foi indicativo de estabilidade para estes sistemas contendo óleo volátil.

5.2.4 Condutividade

A condutividade elétrica é uma ferramenta frequentemente utilizada para determinar os tipos de emulsões e avaliar as alterações físicas durante o período de armazenamento, como também, de prever a estabilidade da mesma (MASMOUDI, LE DRÉAU *et al.*, 2005, CASTELI, MENDONÇA *et al.*, 2008).

O perfil de condutividade elétrica nos sistemas emulsionados contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa estão descritos na Figura 3, demonstrando que todas as emulsões apresentaram variações nos valores da condutividade ao longo do tempo.

As emulsões contendo OEEg foram muito semelhantes na condutividade dentro dos primeiros 30 dias (D30). Nos dias seguintes, as formulações mostraram um aumento na condutividade, que são proporcionais aos valores de EHL, mantendo a semelhança entre elas. Porém, a F1 durante todo o período de armazenamento (D180) foi a formulação que apresentou os maiores valores de condutividade quando comparados com as demais formulações. Além disso, o aumento progressivo e acentuado observado na formulação F1 prevê que o processo de separação ocorrerá primeiro em relação às demais formulações (MASMOUDI, LE DRÉAU *et al.*, 2005). Dessa forma, as formulações de F2 a F14 apresentaram pequenas alterações na condutividade, entre si, devido à proporção dos agentes tensoativos nas formulações, uma vez que, os valores de EHL mais elevados apresentaram uma maior proporção de agente tensoativo hidrofílico, enquanto que os

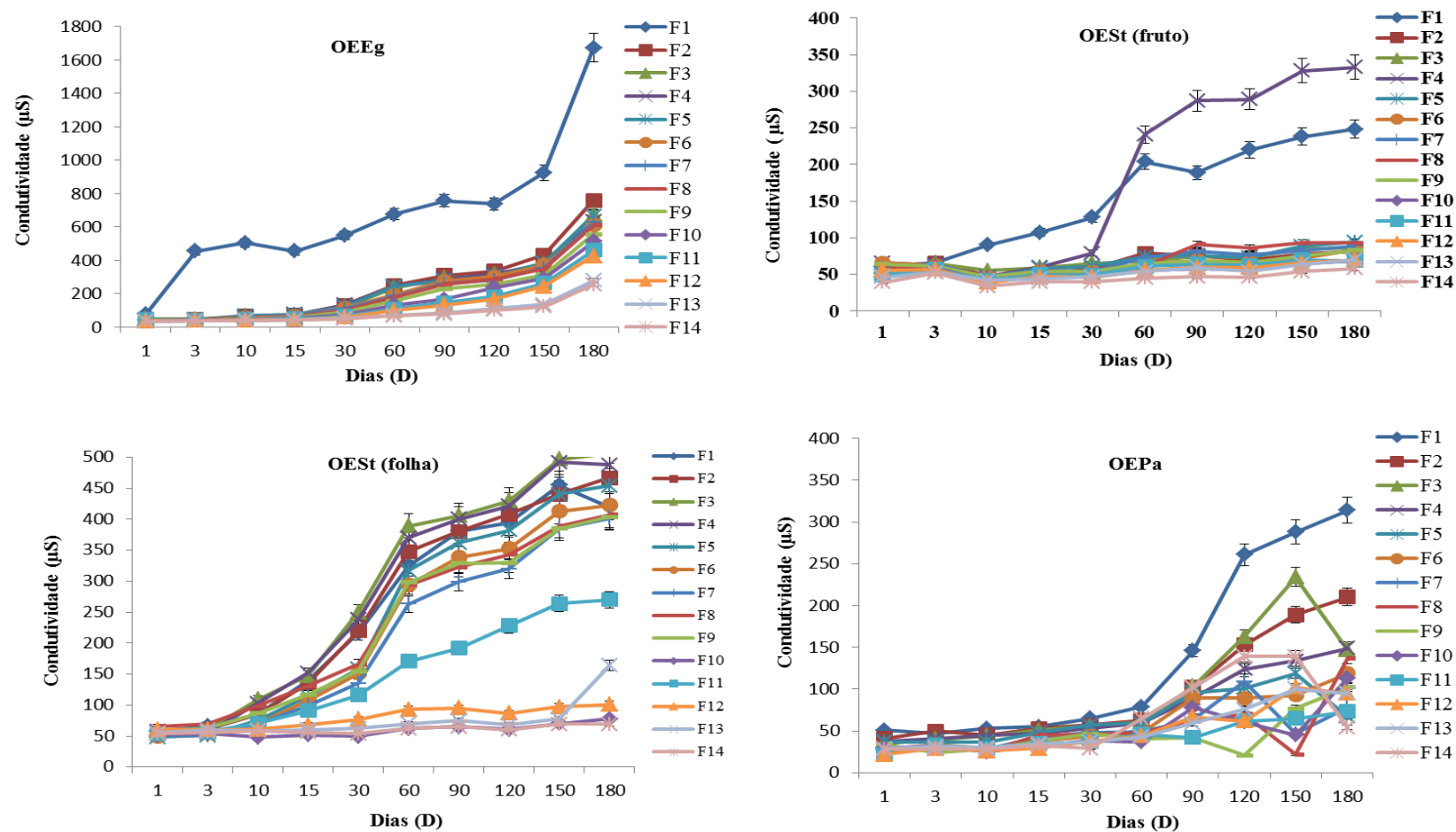
baixos valores de EHL apresentaram uma maior proporção de agente tensoativo lipofílico (SOTIROUDIS, SOTIROUDIS *et al.*, 2005).

As emulsões contendo OEst (fruto) apresentaram pequenas variações de condutividade entre si ao longo do estudo, exceto a formulação F1, que apresentou um aumento acentuado a partir do terceiro dia (D3) e a formulação F4, que apresentou um elevado aumento da condutividade a partir do décimo quinto dia (D15). De acordo com Masmoudi, Le Dréau e colaboradores (2005), o aumento progressivo observado da condutividade, durante vários meses, observado ocorre antes da separação de fases. A formulação F14 apresentou um baixíssimo valor de condutividade durante o período de armazenamento em relação às demais formulações. Apesar do baixo valor da condutividade, possivelmente devido à elevada lipofilicidade do tensoativo presente na mistura dos agentes emulsificantes, o índice de cremagem (IC) no trigésimo dia (D30) previu a instabilidade da formulação F14 à temperatura ambiente.

As emulsões contendo OEst (folha) foram muito semelhantes nos valores de condutividade dentro dos primeiros 15 dias. Nos dias seguintes, as formulações mostraram um aumento na condutividade que são proporcionais às misturas dos tensoativos. No entanto, as formulações F1, F2 e F3 apresentaram os maiores valores de condutividade a partir do décimo dia (D10), confirmando um processo de instabilidade detectado nos resultados do índice de cremagem (IC) do estudo de estabilidade a longo prazo demonstrado na Tabela 4. Dessa maneira, os valores de condutividade das formulações estão relacionados com a fase aquosa, sendo a maior quantidade de água a fase externa (continua), que conduz a um aumento da condutividade (SOTIROUDIS, SOTIROUDIS *et al.*, 2005).

Os resultados da condutividade das formulações contendo OEPa, mostraram um pequeno aumento da condutividade até o nonagésimo dia (D90). A partir do D90, somente as formulações F1, F2, F3 e F4 apresentaram um aumento contínuo dos valores de condutividade, diferentemente das demais formulações, que além do aumento apresentaram uma redução na condutividade. De acordo com Abdullah, Abdulkarim e colaboradores (2011) e Mahmood e Akhtar (2013), o aumento contínuo dos valores de condutividade é atribuído ao processo de coalescência da fase interna, seguido por uma redução, que pode ser atribuído à separação de fases.

Figura 3- As curvas de condutividade das emulsões contendo os óleos essenciais de *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius-fruto* (OEst fruto), *S. terebinthifolius-folha* (OEst folha) e *P. amboinicus* (OEPa) versus, tempo de acordo com as formulações armazenadas a temperatura ambiente.



Fonte: Dados da pesquisa

Pode-se observar que, a partir do tempo D120, o perfil de condutividade confirmou o processo de instabilidade das emulsões F5 a F14 contendo OE_{Pa}, sendo confirmado na Tabela 5 do IC do estudo de estabilidade a longo prazo.

Assim, a condutividade das emulsões pode estar relacionada com a facilidade com que a combinação de compostos formará a interface óleo/água e as alterações nos valores de condutividade também estão relacionados com a instabilidade da dispersão da emulsão (HALBAUT, BARBÉ *et al.*, 1996; BERNARDI, PEREIRA *et al.*, 2011). Dessa maneira, os parâmetros de condutividade dão uma indicação da capacidade da mistura do tensoativo para produzir uma emulsão e da ocorrência de possíveis processos de instabilidade.

5.2.5 Análise quantitativa dos Marcadores dos Óleos Essenciais em Emulsões

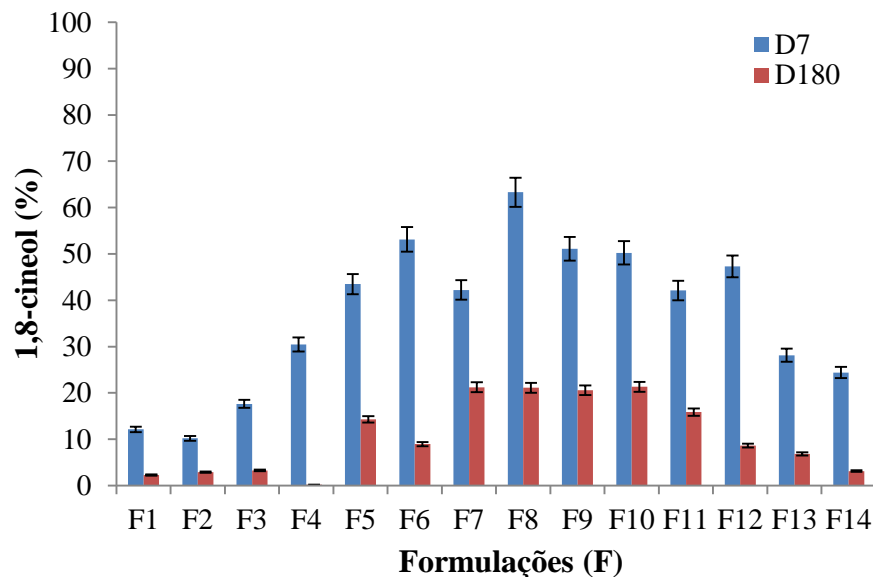
A análise quantitativa desempenha um papel importante no campo farmacêutico através do processo de produção, controle de qualidade até o produto acabado, para conseguir um padrão de qualidade facilitando o desenvolvimento de medicamentos. Esta abordagem torna-se mais crítica e difícil, quando os materiais complexos como matrizes biológicas são utilizadas como substâncias ativas. Em relação aos óleos essenciais, a complexidade química é seguida por propriedades físico-químicas adversas, sendo a avaliação quantitativa utilizada tanto como indicativo de estabilidade, bem como medida de sucesso tecnológico (LUKHOB, SIMMONDS *et al.*, 2006; RUZSÍKOVÁ, SOUČKOVÁ *et al.*, 2015).

Os teores das emulsões foram realizados através da análise quantitativa dos marcadores 1,8-cineol, limoneno, α -pineno e carvacrol. Os marcadores foram analisados por CG, sendo os principais constituintes do OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OE_{Pa}, respectivamente. Os teores das emulsões contendo OE também foram avaliados como indicativo de estabilidade das emulsões. Assim, o conteúdo dos marcadores para cada formulação foi avaliado ao fim dos 7 dias e de 180 dias de armazenamento, à temperatura ambiente. As proporções dos OEs aprisionados em sistemas emulsionados foram estimadas a partir do volume total de OE adicionado à cada formulação.

O teor de 1,8-cineol, após 7 dias, presente nas emulsões contendo OEEg variou entre 16,89 e 67,25%. O teor máximo apresentado para as formulações F11 e F13 foram

61,46 e 67,25, respectivamente. Após 180 dias, houve uma diminuição quanto ao conteúdo do 1,8-cineol. A redução do conteúdo variou de 99,% a 48,21%, possuindo a maior variação a formulação F4 e uma menor variação a F7 (Figura 4).

Figura 4- Teor de 1,8-cineol em emulsões de OEEg após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.



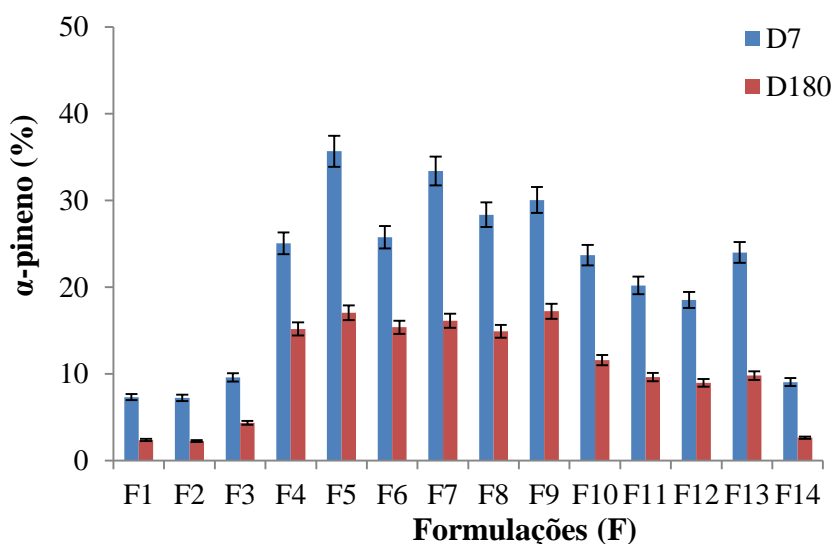
Fonte: Dados da pesquisa

É importante descrever o comportamento do teor residual após 180 dias, uma vez que, devido às características voláteis dos óleos essenciais, podem explicar a dificuldade de aprisionamento e retenção do óleo. Dessa forma, levando em consideração o teor residual de óleo após 180 dias, as formulações contendo OEEg, que apresentaram os maiores teores residuais do marcador foram F7 a F10 (EHL: 7,7 a 10,7), evidenciando a faixa de EHL de maior estabilidade para os sistemas.

As emulsões contendo OEst (fruto) apresentaram, após 7 dias, uma variação de α -pineno de 7,23 a 35,68%. Os maiores teores de α -pineno foram observados nas formulações F5 (35,68%) e F7 (33,40%). Após 180 dias, foi observada uma diminuição do marcador, que variou de 39,42 a 70,77%, para a formulação F4 e F14, respectivamente (Figura 5). A descrição do comportamento do teor residual do óleo, após 180 dias, das formulações F4 a

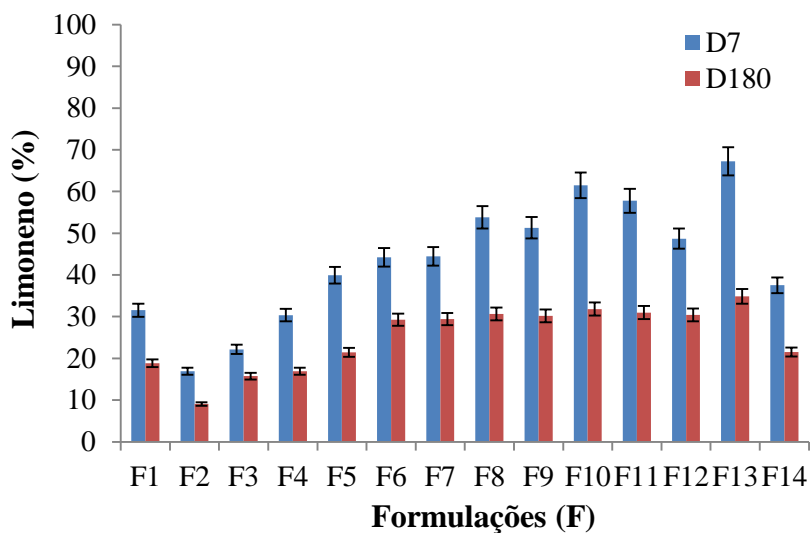
F9 (EHL: 8,7 a 13,7) apresentaram os mais elevados teores do marcador (15,18 a 17,23%), reforçando a faixa de EHL de maior estabilidade para os sistemas emulsionados.

Figura 5- Teor de α -pineno em emulsões de OEst (fruto) após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 6- Teor de limoneno em emulsões de OEst (folha) após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.

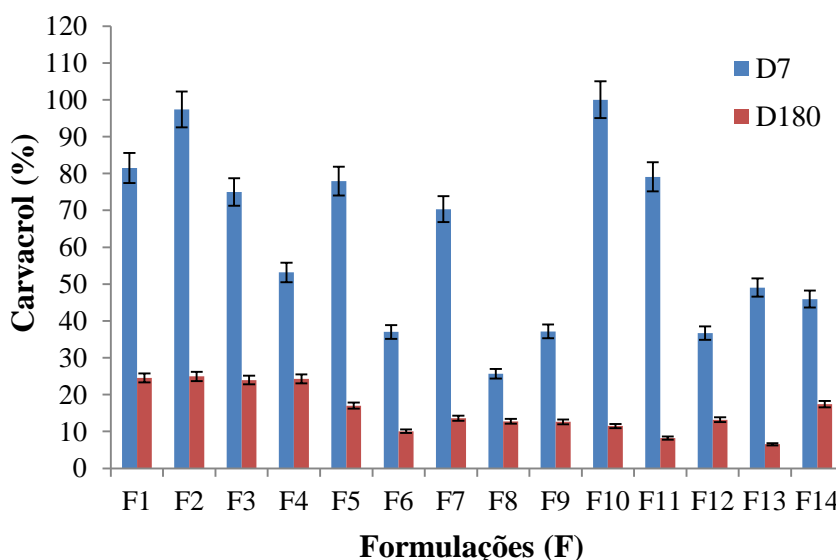


Fonte: Dados da pesquisa

O teor de limoneno, em porcentagem, após 7 dias, presente nas emulsões contendo OEst (folha) variou de 16,89 a 67,25%. Foi observado o teor máximo de limoneno nas formulações F11 (61,46%) e F13 (67,25). A redução do conteúdo do limoneno variou de 28,98 a 48,21%, para a formulação F3 e F10, respectivamente, após 180 dias (Figura 6). Dessa forma, foi observado o comportamento do teor residual de óleo após 180 dias das formulações F6 a F13 (EHL: 4,7 a 11,7), que apresentaram os maiores teores residuais do marcador (29,28 a 30,85%), confirmando os EHLs de maior estabilidade para os sistemas.

Ao analisar o teor de carvacrol, após 7 dias, presente nas emulsões contendo OEPa, observou-se que este variou de 25,6 a 100,00% conforme demonstrado na Figura 7. O teor máximo carvacrol foi observado nas formulações F1 (83%), F2 (97,38) e F10 (100,00%). Quanto ao conteúdo do carvacrol após 180 dias, uma diminuição importante foi observada. A redução do conteúdo variou de 50,3 a 89,6%, a formulação F8 apresentando menor variação e a F11 a maior variação. Desse modo, as formulações F1 a F4 (EHL: 12,7 a 16,7) apresentaram teores residuais mais elevadas do marcador (24%), comprovando a escala de EHL de maior estabilidade para os sistemas.

Figura 7- Teor de carvacrol em emulsões de OEPa após sete (D7) e 180 (D180) dias de armazenamento sob temperatura ambiente. A média e o erro padrão (SEM) de pelo menos três experimentos independentes.



Fonte: Dados da pesquisa

Por conseguinte, as propriedades de óleos essenciais, como por exemplo, a volatilidade pode explicar a dificuldade de aprisionamento e retenção de óleo. Dessa maneira, foi observado o comportamento levando em consideração o teor residual de óleo após 180 dias.

Junto aos outros parâmetros de estabilidade a curto prazo e longo, o teor dos OEs sugeriu, que as formulações mais estáveis são as que obtiveram o teor mais elevado dos seus respectivos marcadores. Segundo Garcia, Tonon e colaboradores (2012), a concentração dos marcadores nas emulsões mostrou um efeito sobre a estabilidade. As formulações F8 (EHL = 9,7), F6 (EHL = 11,7), F9 (EHL = 8,7) e F2 (EHL = 15,7) apresentaram o nível mais alto de 1,8-cineol, α -pineno, limoneno e carvacrol, respectivamente, e os melhores resultados nos estudo de estabilidade a longo e curto prazo.

Assim, o presente trabalho demonstrou a viabilidade das emulsões contendo os OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPA. No entanto, estudos biológicos são necessários para avaliar a atividade biológica dos óleos essenciais e das suas respectivas emulsões.

5.2.6 Diagrama de Fases

Os diagramas pseudoternários, representados na Figura 8 a partir das titulações, permitiram descrever as condições experimentais, bem como, as regiões de formação de sistemas emulsionados (OLIVEIRA, SCARPA *et al.*, 2004; SURaweera, PASANSI *et al.*, 2014; AHMAD, AMIN *et al.*, 2013).

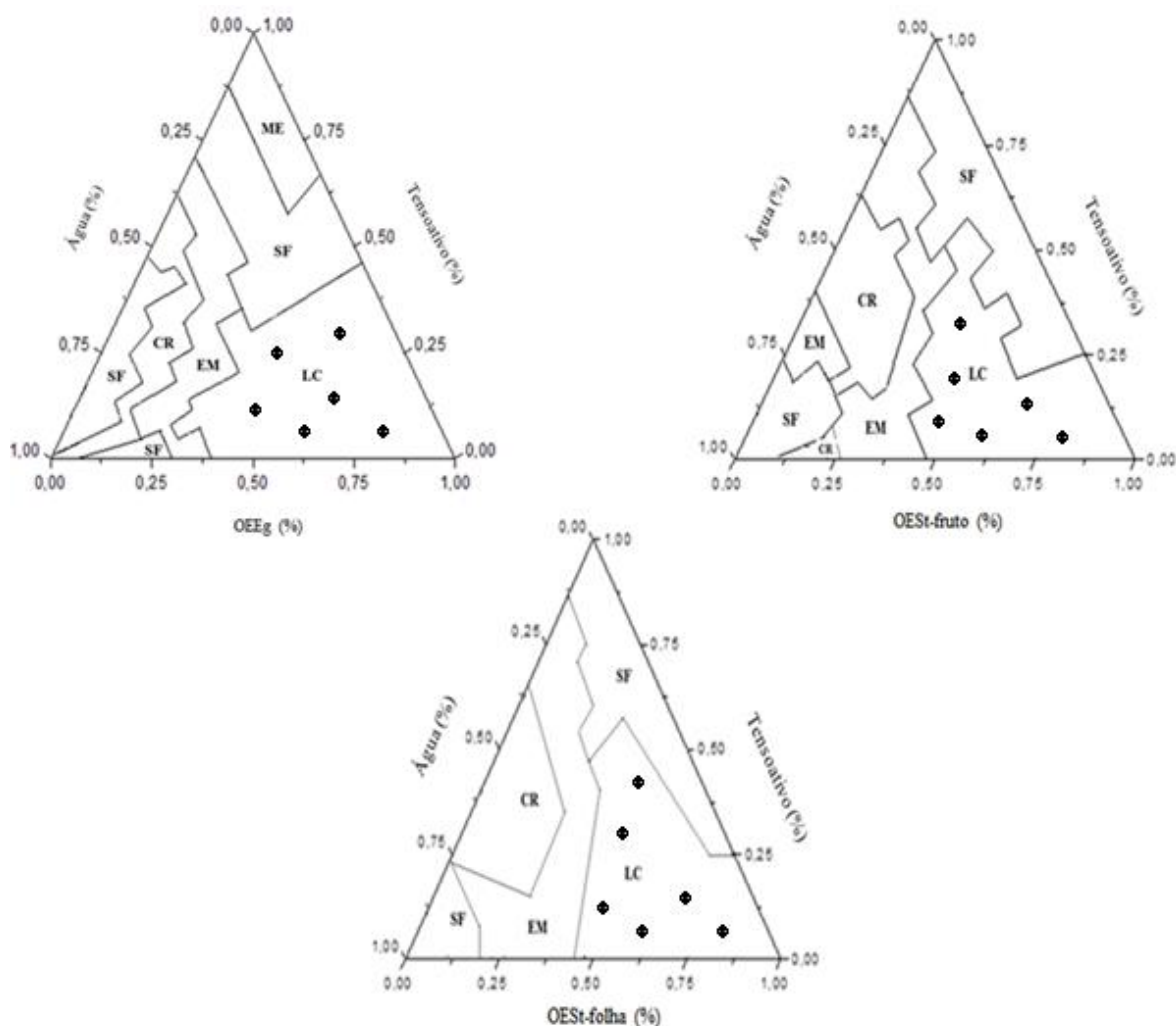
Os diagramas de fases foram obtidos a partir do estudo de EHL dos OEEg, OEst (fruto) e OEst (folha), que apresentaram valores de EHL 9,7; 11,7 e 8,7, respectivamente.

A obtenção do diagrama de fase pseudoternários permitiu conseguir diferentes formulações como, creme, emulsão, microemulsão, loção, como também, definir a região de separação de fase, que foram diferenciados observando os aspectos visuais.

Analisando o diagrama de fases representado na Figura 8 podem ser visto que o sistema emulsionado de óleo/água (O/A) tem uma área maior para loção quando comparado com creme, emulsão, microemulsão e separação de fases. Assim, esta grande área apresenta uma concentração mais elevada de óleo em relação ao tensoativos, e uma maior quantidade de água para a formação da loção. Dessa forma, é possível incorporar uma maior

quantidade de óleo na formulação, tal como esta característica possa ser uma vantagem para o carregamento de medicamentos solúveis em óleo. Dessa maneira, foram desenvolvidas emulsões O/A utilizando à região do diagrama de fase com maior concentração de óleo (MARTI-MESTRES E NIELLOUD, 2002).

Figura 8- Sistema diagrama fase pseudoternário compostos por Tween 20® e Span 80® (tensoativo), água e óleo essencial de *E. globulus* (OEEg), *S. Terebinthifolius-fruto* (OEst-fruto), *S. Terebinthifolius-folha* (OEst-folha). EM-Emulsão, CR-Creme, SF-Separação de Fase, LC-Loção.



Fonte: Dados da pesquisa

Deste modo, com a construção do diagrama de fases, foi possível determinar as condições experimentais sob as quais foi possível obter loções, regiões de transição entre os limites de

sistemas emulsionados, e um amplo número de amostras de diferentes composições originadas com rapidez, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (KANTARCI, ÖZG NEY *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009).

Dessa forma, foram selecionados 6 formulações indicadas no diagrama de fases, de cada OE, exceto o OE_{Pa}, que foram obtidas 2 formulações devido à quantidade escassa de matéria-prima, para a realização de ensaios de atividade antimicrobiana.

5.2.7. Termogravimetria (TG)/Análise Térmica Diferencial (DTA)

A TGA/DTA foi realizada para determinar a percentagem de perda de massa, perfil térmico e acompanhar o comportamento de degradação térmica, das emulsões contendo 5% de óleo, 2% de surfactante e 73% de água. As referidas emulsões continham óleo essencial de *E. globulus* (EEg), *Schinus terebinthifolius*-fruto (ESt-fruto), *Schinus terebinthifolius*-folha (ESt-folha) e *Plectranthus amboinicus* (EPa) uma vez que, as diferentes composições dos óleos essenciais influenciam nas suas propriedades térmicas.

As curvas termogravimétricas (TG) dinâmicas dos diferentes óleos essenciais obtidos na atmosfera de ar sintético, nas razões de 10°, 20° e 40°C/min., demonstraram uma perda de massa e uma única fase de decomposição. Com o aumento da razão de aquecimento, foi observado um deslocamento de temperatura de volatilização.

Almeida, Lima (2010) descreveu a análise termogravimétrica como sendo uma ferramenta importante para caracterizar o perfil térmico das vitaminas e cremes, e pode ser usado para análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade em indústrias de cosméticos.

O termograma da emulsão EEg, demonstrou na faixa de temperatura de 25 a 111,0°C, uma perda de massa de 100%. Nas curvas DTA, analisadas, no apêndice A (Figura 1), observou-se um evento endotérmico. Além disso, a EEg apresentou uma temperatura *onset* de 54°C e *endset* de 129°C e o ponto de evaporação com uma temperatura de pico em 89,61°C.

Na emulsão (ESt-fruto), a curva termogravimétrica apresentou, na faixa de temperatura de 25 a 134°C, uma perda de massa 92%. Porém, nas curvas de DTA, observa-se um evento endotérmico como também, a ESt-fruto apresentou uma temperatura *onset* de

48°C e *endset* de 121°C e o ponto de evaporação com uma temperatura de pico em 87°C (Apêndice A- Figura 2).

Ao analisar as curvas TG da ESt-folha, foi observada uma única etapa de decomposição com início em 31°C e com término em 212°C com perda de massa de 95%. Avaliando-se o perfil térmico diferencial (DTA) da ESt-folha apresentou temperatura de pico 88,56°C com temperatura *onset* de 48°C e *endset* de 123°C (Apêndice A- Figura 3)

Analisando as curvas apresentadas na (Apêndice A- Figura 4) observa-se no TG da EPa, que obteve uma perda de massa 99,99% na faixa de temperatura de 25 a 195°C. Na curva de DTA da EPa, observou-se um evento endotérmico o qual apresentou uma temperatura *onset* de 48°C e *endset* de 122°C, com temperatura de pico 89,50°C. Além disso, pode ser observado um processo de oxidação entre 180 e 200°C. (Apêndice A- Figura 4)

Daneluti (2013) demonstrou que as curvas termogravimétricas das emulsões apresentaram uma perda de massa inicial entre as temperaturas de 25 a 101°C, sendo atribuída a eliminação de água livre ou ligada na emulsão. A segunda fase, entre 104 e 150°C, houve uma perda de massa que foi atribuída à remoção da água mais fortemente ligada à emulsão.

Ademais, quantidade elevada de água presente na formulação das emulsões promoveu temperatura de pico reduzida sem alterar as características físico-químicas do sistema emulsionado. Dessa forma, a análise térmica é uma ferramenta importante para caracterizar e determinar um padrão de qualidade e a estabilidade térmica das emulsões.

5.2.7.1 Cinética de Evaporação

5.2.7.1.2 Estudos Cinéticos pelo método de Ozawa

A ordem de estabilidade térmica das emulsões apresentou a seguinte ordem: ESt-fruto > ESt-folha > EPa > EEG. Por conseguinte, podem ser observadas, na Tabela 6, as emulsões com as suas respectivas energias de ativação (*Ea*). Exceto a EPa, que apresentou energia de ativação semelhante ao OEPa. Dessa forma, foi possível demonstrar que o sistema emulsionado conferiu uma proteção térmica aos OEs.

Tabela 6- Parâmetros Cinéticos de Ozawa: ordem de reação (n), fator de frequência (A) e energia de ativação (E_a) de dados termogravimétricos dinâmicos das emulsões contendo óleo essencial de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* (ESt-fruto), *Schinus terebinthifolius* (ESt-folha) e *Plectranthus amboinicus* (EPa).

Amostras	Ordem de reação (n)	A (min^{-1})	E_a (kJ/mol)
<i>EEg</i>	0	$5,379 \times 10^5$	41,90
<i>ESt - fruto</i>	0	$7,395 \times 10^7$	55,38
<i>ESt - folha</i>	0	$1,638 \times 10^7$	51,35
<i>EPa</i>	0	$7,980 \times 10^6$	46,37

Fonte: Dados da pesquisa

5.2.7.2 Pressão de Vapor

A pressão de vapor entre as emulsões apresentaram na razão de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a seguinte ordem de estabilidade: ESt-fruto > ESt-folha > EPa > EEg. Na razão de aquecimento $20^\circ\text{C}/\text{min}$, a pressão de vapor apresentou a seguinte ordem de estabilidade: ESt-folha > ESt-fruto > EPa > EEg. Na razão de $40^\circ\text{C}/\text{min}$, a pressão de vapor apresentou a seguinte ordem: EEg > EPa > ESt-folha > ESt-fruto. Dessa forma, podemos determinar que a taxa de aquecimento das emulsões possa promover possíveis degradações dos OEs veiculados no sistema emulsionado, como também, alterar a estabilidade da emulsões.

Tabela 7- Dados de pressão de vapor das emulsões contendo óleo essencial de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* (ESt-fruto), *Schinus terebinthifolius* (ESt-folha) e *Plectranthus amboinicus* (EPa). Nas razões de aquecimento de 10, 20 e $40^\circ\text{C}/\text{min}$., em atmosfera de ar sintético ($50^\circ\text{C}/\text{min}$.) ($n=3$).

Amostras	\pm Pressão de Vapor		
	Razão de Aquecimento		
	$10^\circ\text{C}/\text{min}$.	$20^\circ\text{C}/\text{min}$.	$40^\circ\text{C}/\text{min}$.
<i>EEg</i>	105537,76	43494,87	16996,07
<i>ESt - fruto</i>	38450,51	22920,36	17868,94
<i>ESt - folha</i>	46921,17	21635,91	17452,46
<i>EPa</i>	53313,04	23012,72	17090,28

Fonte: Dados da pesquisa

5.3 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade de produção dos sistemas emulsionados contendo óleos essenciais. Os parâmetros Índice de cremagem, pH, condutividade, teor dos marcadores foram utilizados para caracterizar as emulsões obtidas. As emulsões apresentaram estabilidade satisfatória durante 180 dias, quando armazenadas à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e à baixa temperatura ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$). As formulações mais estáveis contendo óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius*, *Plectranthus amboinicus* apresentaram o EHL 9,7; 11,7; 8,7 e 15,7, respectivamente. O diagrama de fase permitiu a identificação visual de vários sistemas dispersos, tais como, emulsões, cremes e loções sendo selecionadas seis formulações contendo OEeg, OEst-fruto, OEst-folha e duas formulações OEpa.

A caracterização físico-química dos sistemas emulsionados possibilitou identificar os melhores sistemas para o desenvolvimento de transportadores de substâncias oleosas podendo ser empregados na formulação contendo óleos essenciais.

Capítulo III

**Avaliação da atividade antibacteriana dos
óleos essenciais de *Eucaliptus globulus*, *Schinus
terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus* e
suas respectivas emulsões**

6. CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* E *Plectranthus amboinicus* E SUAS RESPECTIVAS EMULSÕES

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* E *Plectranthus amboinicus* e suas respectivas emulsões.

Os óleos essenciais foram testados na concentração 1024 até 32µg/mL e solubilizado em dimetilsulfóxido-DMSO, numa proporção de até 10%, para não interferir sobre os microrganismos. As emulsões contendo *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa), foram testados na concentração 1024 até 32 µg/mL. Para o controle de atividade antifúngica e antibacteriana, foi utilizado a Nistatina 100UI e Cloranfenicol a 100µg/mL, respectivamente.

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em Caldo Sabouraud Dextrose–CSD para leveduras e em RPMI 1640 (ACUMEDIA/Índia); e Caldo Nutriente-CN para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA). Os meios foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

6.1.2 Microorganismos

Nos ensaios para avaliação da atividade biológica *in vitro* dos quatro óleos essenciais foram incluídas as cepas de leveduras: *Candida albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-108, *C. albicans* LM-86, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *C. tropicalis* LM-6, *C. tropicalis* LM-14, *Candida krusei* LM-13 e *C. krusei* LM-08; e as cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. aureus* M-117, *S. aureus* LM-197 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *P. aeruginosa* A-03 e *P. aeruginosa* LM-260.

Os ensaios para avaliação da atividade biológica das emulsões foram incluídos as cepas de leveduras: *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-86, *C. tropicalis* LM-14, *C. krusei* LM-08; e as cepas de bactérias: *S. aureus* ATCC-25923 e *P. aeruginosa* A-03.

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados, Agar Sabouraud Dextrose - ASD para leveduras; e Agar Nutriente - AN para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e conservadas a 4°C e a 35°C, respectivamente.

A suspensão dos microrganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10^6 UFC/mL (HADACEK AND GREGER 2000, CLSI 2002).

6.1.3 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100µL do meio líquido CSD (leveduras) ou CN (bactérias) duplamente concentrado. Posteriormente, 100µL da solução dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024µg/mL até 32µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrará a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10µL do inóculo dos microrganismos nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

O controle de crescimento dos microrganismos no meio de cultura foi realizado com antifúngico Nistatina (100UI) para leveduras; e Cloranfenicol (100µg/mL) para bactérias. As placas foram seladas e incubadas a 35-37°C por 24-72 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle. Para determinar a CIM bacteriana, foi adicionado 20µL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB). Dessa

maneira, a mudança de coloração (azul para vermelho) confirma o crescimento microbiano e quando não ocorrer a alteração da cor significa a ausência de crescimento microbiano (MANN E MARKHAM, 1998). A CIM foi considerada como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (SANTOS, REBELO *et al.* 2012).

Houghton, Howes e colaboradores (2007) elencaram critérios para categorizar a atividade antimicrobiana dos produtos sendo interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-100µg/mL=excelente/ótima atividade; 100-500µg/mL=moderada atividade; 500-1000µg/mL=baixa atividade; >1000µg/mL=produto inativo.

6.1.4 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* (OEEg), *Schinus terebinthifolius* (OEst-fruto), *Schinus terebinthifolius* (OEst-folha) e *Plectranthus amboinicus* (OEPa) e suas respectivas emulsões, em infecções de unhas causadas por *Candida albicans*.

Para a realização do estudo *ex vivo* em fragmentos de unhas, as amostras foram coletadas de 10 voluntários, dos quais 5 homens e 5 mulheres maiores de 18 anos. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CCS/UFPB), com o número de protocolo 0549/14, CAAE: 36919814.4.0000.5188. Os processos de coleta dos fragmentos das unhas foram realizados no Laboratório de Micologia (CCS/UFPB) e não conferiu nenhum risco ou dano potencial aos voluntários, pois foram seguidos os procedimentos rotineiros de coleta de material para análise em Laboratório de Micologia Clínica (PEREIRA, 2012).

Vários fragmentos de unhas das mãos foram considerados isentos de fungos quando examinados em KOH a 30% em microscopia, no qual não foi detectada a presença de fungos. Em seguida, foram limpas com etanol a 70%, seco em uma placa de Petri estéril a 37°C.

Por conseguinte, em placas de microdiluição, uma alíquota de 10µL da suspensão de *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-86 foram inoculadas sobre cada fragmento

de unha por 1 hora, seguida da adição de 200 μ L de água destilada estéril (controle negativo) ou acrescido de geraniol, cintronelol e cetconazol nas concentrações CIMx2, CIM, CIM/2. Todo o sistema foi incubado por 5 dias para ser realizada a leitura. A análise se baseou na observação do crescimento fúngico sobre os fragmentos ungueais usando microscopia óptica em um modelo padronizado por Pereira (2012).

O diagnóstico da infecção micótica foi baseado no conjunto dos seguintes critérios: aspecto clínico da unha; achado de estruturas fúngicas no exame direto da unha com KOH a 30%; crescimento da colônia do mesmo fungo em duas amostras consecutivas. Os resultados positivos para o gênero *Candida* spp. foi confirmado pela presença de hifas, pseudo-hifas e blastoconídios em exame micológico direto, tal como descrito por (ARAÚJO, BASTOS *et al.* 2003).

A avaliação estatística destes resultados empregando-se o teste de Fischer para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, San Diego, CA, EUA.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais e das Emulsões contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa.

6.2.1.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram testados contra os agentes patogênicos bacterianos e fúngicos. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram selecionadas oito espécies de fungos patogênicos e seis espécies de bactérias. A atividade inibidora dos OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa foram estudados in vitro pelo método de microdiluição e os dados encontram-se registrados na Tabela 1.

A avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de OEEg apresentou uma baixa atividade inibitória sobre 63% das três espécies de *Candida* (CIM 1024µg/mL) e 33% das cepas bacterianas *S. aureus* e *P. aeruginosa* (512 µg/mL) mostraram atividade moderada. Os resultados obtidos demonstraram que as cepas *C. albicans* (LM-108), *C. tropicalis* (ATCC-130803 e LM-6), *S. aureus* (LM-117 e LM 197) e *P. aeruginosa* (ATCC-25853 e LM-260) foram resistentes frente ao OEEg.

Estudos realizados por Tyagi e Malik (2011), avaliaram a ação antimicrobiana *E. globulus*, apresentou uma CIM bacteriana de 2,25 mg/mL, e também apresentou ação em fungos com uma CIM variando entre 1,13-9,0 mg/mL. No presente estudo, a CIM para bactérias e fungos foram 512 e 1024µg/mL, respectivamente. Sendo estes valores diferentes daquele obtido por Tyagi e Malik (2011) possivelmente devido a localização geográfica e forma de obtenção.

Gilles, Zhao *et al.* (2010), verificou a atividade antibacteriana de três espécies de *Eucalyptus* os quais demonstraram possuir fraca atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa* diferindo do presente estudo que apresentou atividade moderada. Além disso, (Đakov 2011) verificou atividade antimicrobiana, onde a concentração inibitória mínima revelou uma menor atividade contra a *P. aeruginosa* enquanto que a maior atividade foi para *S. aureus* contrastando com o resultado do presente trabalho que mostrou uma CIM igual entre a *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima-CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais de *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) testados sobre leveduras e bactérias, pela técnica de microdiluição (1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$).

Cepas	OEEg	OEst (fruto)	OEst (folha)	OEPa	Controle Microorganismos	Controle Nistatina/Cloranfenicol
<i>C. albicans</i> ATCC-90028	1024	256	512	128	+	-
<i>C. albicans</i> LM-108	R	R	512	128	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	1024	256	512	128	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	R	R	R	128	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-6	R	R	R	128	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	1024	256	512	R	+	-
<i>C. krusei</i> LM-13	1024	R	512	128	+	-
<i>C. krusei</i> LM-08	1024	256	512	128	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC- 25923	512	256	512	512	+	-
<i>S. aureus</i> LM-117	R	512	512	512	+	-
<i>S. aureus</i> LM-197	R	512	R	512	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	R	R	R	512	+	-
<i>P. aeruginosa</i> A- 03	512	R	R	512	+	+
<i>P. aeruginosa</i> LM-260	R	R	R	R	+	+

+: Crescimento do microrganismo

-: Ausência de não crescimento do microrganismo

R: resistência

Fonte: Dados da pesquisa

O OEst (frutos) produziu inibição sobre 50% das cepas fúngicas cujo CIM foi de 256µg/mL apresentando uma atividade moderada sobre *C. albicans* (ATCC-90028, LM-86), *C. tropicalis* LM-14 e *C. krusei* LM-08. Quanto às cepas bacterianas, o OEst (frutos) inibiu o crescimento de *S. aureus* (ATCC-25923, M-117 e LM-197) sobre 33% dos microorganismos, cujo CIM foi 256µg/mL, 512µg/mL e 512µg/mL respectivamente, demonstrando uma atividade moderada. As cepas fúngicas, que apresentaram resistência foram a *C. albicans* (LM-108), *C. torpicalis* (ATCC-130803 e LM-6), *C. krusei* (LM-13) e as bacterianas foram *P. aeruginosa* (ATCC-25853, A-03 e LM-260).

O OEst (folha), na concentração de 512 µg/mL, inibiu o crescimento de 75% das cepas fúngicas demonstrando uma atividade moderada. As cepas de *C. tropicalis* (ATCC-13803 e LM-6) foram resistentes ao referido óleo essencial. Dentre as cepas bacterianas, apenas *S. aureus* ATCC-25923 e *S. aureus* M-117 apresentaram sensibilidade ao produto, onde a CIM foi de 512µg/mL demonstrando uma atividade moderada. As cepas bacterianas que apresentaram resistência foram *S. aureus* LM-197, *P. aeruginosa* ATCC-25853, A-03 e LM-260.

Estudos realizados por Gundidza, Gweru e colaboradores (2009), demonstraram uma elevada atividade do óleo essencial de *S. terebinthifolius*, no Zimbabwe, com ação antibacteriana, bem como atividade antifúngica moderada.

Almeida Freires, Alves e colaboradores (2011), verificaram que as linhagens fúngicas, *C. albicans*, *C. torpicalis* e *C. krusei* são susceptíveis à ação da tintura da casca de *S. terebinthifolius* possuindo uma atividade moderada semelhante ao presente estudo.

O OEst obtidos da folha e do fruto apresentaram atividade moderada para fungos e bactérias conforme descrito no presente estudo.

No estudo de avaliação da atividade antimicrobiana o OEPa, foi o que apresentou melhor atividade inibitória sobre o crescimento dos microrganismos. Dessa forma, 88% dos fungos, apresentaram sensibilidade ao OEPa, cuja CIM foi 128µg/mL com uma ótima atividade. O referido produto, também apresentou atividade inibitória sobre 83% das cepas de *Staphylococcus* e de *Pseudomonas*, cuja CIM foi de 512µg/mL com uma atividade moderada. As cepas *C. albicans* LM-14 e *P. aeruginosa* LM-260 foram resistentes ao OEPa.

Pesquisas realizadas por Manjamalai, Alexander e colaboradores. (2012), mostraram uma atividade antifúngica moderada para o extrato de *P. amboinicus* inibindo o crescimento de 75% dos fungos. Dessa forma, o presente trabalho apresentou uma melhor atividade antifúngica quando comparado com os resultados obtidos por Manjamalai, Alexander (2012).

Galvão Rodrigues e colaboradores (2013) demonstraram que o óleo essencial de *P. amboinicus* apresentou uma CIM de 32µg/mL para *S. aureus* SA358 possuindo forte atividade antibacteriana e resistente *P. aeruginosa*. Assim, observou-se que no presente estudo o *S. aureus* e *P. aeruginosa* mostraram uma CIM de 512µg/mL diferentemente dos resultados mostrados por Galvão Rodrigues e colaboradores (2013).

Os óleos essenciais que apresentaram uma melhor atividade antifúngica e antimicrobiana em ordem decrescente foram o OEPa, OES_t (fruto), OES_t (folha) e OEEg de acordo com os valores do CIM. Os óleos essenciais em estudo podem ser explorados como antimicrobiano natural para o tratamento de várias doenças infecciosas causadas por cepas bacterianas e fúngicas. Dessa forma, os óleos essenciais em estudo podem ser explorados como antimicrobiano natural para o tratamento de diversas doenças infecciosas causadas por cepas bacterianas e fúngicas apresentando uma perspectiva promissora para aplicações farmacêuticas.

Os resultados podem ser considerado de ótima ou moderado atividade biológica, levando em consideração os parâmetros estabelecidos por (HOLETZ, PESSINI *et al.*, 2002, HOUGHTON, HOWES *et al.* 2007).

6.2.1.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Emulsões

Avaliou-se a atividade biológica *in vitro* das emulsões E1 a E6 (OEEg), E7 a E12 (OES_t fruto), E13 a E18 (OES_t folha), E19 e E20 (OEPa), em duplicata utilizando a técnica microdiluição e os resultados estão registrados na Tabela 2.

A avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana das emulsões contendo OEEg produziu atividade inibitória sobre as três espécies de *Candida* e sobre as duas cepas bacterianas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) exceto a E2, que apresentou resistência às mesmas.

Dentre as formulações que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana a E4 (CIM 256µg/mL) e E6 (CIM 256µg/mL), demonstraram possuir a melhor atividade.

As emulsões contendo OEst-fruto demonstraram atividade inibitória sobre as três espécies de *Candida* e resistência sobre as cepas bacterianas. Dentre as formulações que apresentaram as melhores atividades antifúngicas foram às emulsões E8 (CIM 256µg/mL), E10 (CIM 512µg/mL) e E12 (CIM 512µg/mL).

As emulsões contendo OEst-folha demonstraram atividade inibitória sobre as espécies de *Candida* e resistência sobre as cepas bacterianas. As formulações que apresentaram as melhores atividades antifúngicas foram às emulsões E14 (CIM 256µg/mL), E16 (CIM 256µg/mL) e E18 (CIM 128µg/mL).

No estudo de avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana as emulsões contendo OEPA, apresentaram melhor atividade inibitória sobre o crescimento dos microrganismos. Dentre as formulações contendo o referido óleo essencial a formulação E20 (CIM 64 µg/mL) foi a que apresentou a melhor atividade antifúngica e a E19 (CIM 128 µg/mL) apresentou melhor atividade antibacteriana.

Quando comparamos o óleo essencial puro com as emulsões observa-se que houve uma redução no CIM das formulações. Este fato ocorreu porque de acordo com Khan, Akhtar *et al.* (2011), a principal vantagem dos sistemas emulsionados é aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de drogas terapêuticas oleosas. Este estudo demonstrou que a utilização do sistema emulsionado, apresentou melhores resultados que o óleo essencial puro.

As emulsões que apresentaram os melhores resultados de atividade antifúngica foram avaliadas em infecções *ex vivo* promovida por *C. albicans* em fragmentos de unhas com o interesse em desenvolver um agente tópico para a aplicação em micose.

Tabela 2- Resultado da CIM ($\mu\text{g/mL}$) das emulsões contendo *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEST-fruto), *S. terebinthifolius* (OEST-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) OEEg, OEST (fruto), OEST (folha) e OEPa.

Porcentagem (%)						CIM (µg/mL)						
Emulsões	Proporção Óleo/Tensoativo	Óleo	Tensoativo	Água	Total		<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-86	<i>C. tropicalis</i> LM-14	<i>C. krusei</i> LM-08	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>P. aeruginosa</i> A-03
E1 OEEg	08:02	22,4	5,6	72	100		>1024	>1024	1024	1024	1024	1024
E2 OEEg	08:02	28,8	7,2	64	100		1024	1024	512	1024	R	256
E3 OEEg	06:04	31,2	20,8	48	100		>1024	256	256	256	256	256
E4 OEEg	08:02	35,2	8,8	56	100		256	256	256	256	256	256
E5 OEEg	07:03	36,4	15,6	48	100		512	512	512	256	512	512
E6 OEEg	08:02	41,6	10,4	48	100		256	256	256	256	256	256
E7 OEst fruto	08:02	22,4	5,6	72	100		R	R	R	R	R	R
E8 OEst fruto	08:02	28,8	7,2	64	100		256	512	256	256	512	R
E9 OEst fruto	06:04	31,2	20,8	48	100		R	R	R	R	R	R
E10 OEst fruto	08:02	35,2	8,8	56	100		512	512	512	512	R	R
E11 OEst fruto	07:03	36,4	15,6	48	100		512	1024	512	512	R	R
E12 OEst fruto	08:02	41,6	10,4	48	100		512	512	512	512	R	R
E13 OEst folha	08:02	22,4	5,6	72	100		R	R	R	R	R	R
E14 OEst folha	08:02	28,8	7,2	64	100		256	256	512	256	1024	R
E15 OEst folha	06:04	31,2	20,8	48	100		R	R	R	R	R	R
E16 OEst folha	08:02	35,2	8,8	56	100		256	256	512	128	R	R
E17 OEst folha	07:03	36,4	15,6	48	100		R	R	R	R	R	R
E18 OEst folha	08:02	41,6	10,4	48	100		256	128	512	128	512	R
E19 OEPa	08:02	35,2	8,8	56	100		64	128	64	64	256	64
E20 OEPa	08:02	41,6	10,4	48	100		64	128	128	64	128	64
Controle Micro-org.							+	+	+	+	+	+
Controle Meio							-	-	-	-	-	-

+: Crescimento do microrganismo

--: Ausência de não crescimento do microrganismo

R: resistência

Fonte: Dados da pesquisa

6.3 Estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais de OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa e suas respectivas emulsões sobre as *onicomicoses* causadas por *Candida albicans*.

Devido à boa atividade antifúngica apresentada pelos óleos essenciais veiculados em sistemas emulsionados é de suma importância a realização de estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, utilizando-se estes óleos como substância ativa uma vez que, ao veicular o óleo essencial numa forma farmacêutica a tendência é melhorar a estabilidade da formulação final, como também, as características biofarmacêuticas.

Os estudos de atividades antifúngicos *in vitro* são importantes, pois fornecem informações sobre a potência e a capacidade antifúngica dos óleos essenciais e das emulsões, como também, para justificar a continuidade das pesquisas com o objetivo de futuras propostas de aplicações clínicas (CLEELAND; SQUIRIS, 1991). Com base nisto, foi aplicado o modelo *ex vivo* de infecção em fragmentos de unhas com o objetivo de avaliar a ação dos óleos e das emulsões sobre a *C. albicans* conforme demonstrado na Tabela 3. Além disso, o tratamento para infecções acometidas por *Candida* tornou-se um desafio, pois o tratamento é difícil devido à natureza eucariótica das células fúngicas, que são similares às células hospedeiras (ENDO, CORTEZ *et al.* 2010).

Com base nos resultados obtidos, os OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa inibiu o crescimento da *C. albicans* ATCC 90028 na CIM 256µg/mL, 256µg/mL, 512µg/mL e 128µg/mL, respectivamente. Os resultados para a cepa *C. albicans* LM 86 foram semelhantes.

Tabela 3- Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais *E. globulus* (OEEg), *S. terebinthifolius* (OEst-fruto), *S. terebinthifolius* (OEst-folha) e *P. amboinicus* (OEPa) e suas emulsões testadas estirpes fúngicas das unhas fragmentos mãos pela técnica de microdiluição. Os dados são a média ($n = 3$). Uma análise estatística indicou a $P < 0,05$.

Emulsão	Óleo	Tensoativo	Água	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-86
OEEg	-	-	-	256	256
OEst (fruto)	-	-	-	512	512
OEst (folha)	-	-	-	512	512
OEPa	-	-	-	128	128
E4 OEEg	35,2	8,8	56	256	256
E6 OEEg	41,6	10,4	48	256	256
E10 OEst fruto	35,2	8,8	56	512	512
E12 OEst fruto	41,6	10,4	48	512	512
E16 OEst folha	35,2	8,8	56	256	256
E18 OEst folha	41,6	10,4	48	256	128
E19 OEPa	35,2	8,8	56	64	128
E20 OEPa	41,6	10,4	48	64	128
Controle Micro-org.				+	+
Controle Meio				-	-

+: Crescimento do microrganismo -: Ausência de não crescimento do microrganismo R: resistência

Fonte: Dados da pesquisa

Quando se compara a CIM do óleo essencial com as suas respectivas emulsões, é observada uma redução na concentração inibitória mínima das formulações E19 e E20, mostrando que foram as emulsões que apresentaram os melhores resultados.

As formulações contendo OEEg, OEst (fruto), OEst (folha) e OEPa, atuaram como agente antifúngico, quando testado em unhas e de acordo com os autores Czub e Baginski (2006) e Vandeputte, Ferrari *et al.* (2011), os óleos essenciais atuam no nível da membrana celular e nas enzimas envolvidas na manutenção da parede celular dos microorganismos. Tendo em vista, que a membrana plasmática da célula fúngica compreende uma estrutura

dinâmica composta principalmente de lípidos e proteínas (BOWMAN E FREE, 2006; CHEN E VILJOEN, 2010).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais descritos por Souza *et al.* (2005), demonstraram a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática promovendo a perda de adenosina trifosfato (ATP), este atribuído ao grupo hidroxil (OH) do anel fenólico, favorecendo o rompimento da estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios (MOREIRA, PONCE *et al.*, 2005; BEN ARFA *et al.*, 2006; AHMAD, KHAN *et al.*, 2011; CHAVAN E TUPE *et al.*, 2014).

Os resultados apresentaram-se relevantes, pois vários agentes antifúngicos sintéticos (azóis, benzoxaborole, ciclopirox, e amorolfina), utilizados no tratamento contra as onicomicoses apresentam resistência microbiana devido o uso indiscriminado em hospitais e farmácias o que proporciona uma baixa taxa de cura. Dessa forma, se faz necessário a busca de novos tratamentos capazes de atuar por diferentes mecanismos de ação para substituir as terapias que já desenvolveram resistência aos microorganismo (ROUTT, JIM *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais são promissores, porque eles são constituídos de vários compostos que atuam em diversos mecanismos de ação possíveis, devido à mistura de diferentes constituintes. Além disso, apresentam sinergismo entre estes constituintes, como também, atingi diferentes partes das células microbianas evitando, assim, resistência microbiana aos produtos fitoterápicos (FLORES, BECK *et al.*, 2016).

Segundo relatos de Del Rosso (2014), existe uma necessidade de desenvolver novos produtos tópicos eficazes e seguros, porque há um grande número de terapias tópicas que não tiveram sucesso nos últimos 15 anos. Até meados de 2014, a FDA aprovou um medicamento tópico para o tratamento de onicomicose que não apresentou resultados impressionantes sendo utilizado apenas como um paliativo (DEL ROSSO *et al.*, 2014).

6.4 CONCLUSÃO

O estudo destaca a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *E.globulus*, *S. terebinthifolius*-fruto, *S.terebinthifolius*-folha e *P.amboinicus* e das emulsões contendo OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa. Os resultados indicaram que o OEPa mostrou possuir a melhor atividade antimicrobiana entre os óleos essenciais. O OEPa apresentou dentre as atividades antimicrobianas, uma melhor ação antifúngica demonstrando ser potencial candidato para a preparação de novos medicamentos. Os sistemas emulsionados contendo OEEg, OEst-fruto, OEst-folha e OEPa apresentaram ação antibacteriana e antifúngica. Por fim, as emulsões testadas frente à *C. albicans*, em fragmentos de unhas, apresentaram excelentes resultados comprovando a viabilidade da utilização das formulações como antifúngicos.

Capítulo IV

**Avaliação da toxicidade das emulsões de
Eucalyptus globulus, *Schinus terebinthifolius* E
*Plectranthus amboinicus***

7. CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS EMULSÕES DE *Eucaliptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* E *Plectranthus amboinicus*.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Estudo de toxicidade aguda não clínica de emulsões contendo óleo essencial *E. globulus*, *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*

Os ensaios toxicológicos foram conduzidos utilizando as emulsões de *E. globulus* (EEg), *S. terebinthifolius*-folha (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa). Para cada emulsão foram preparadas 100 mL contendo 28,8% de óleo essencial, 7,2% de tensoativo e 64% de água.

Foram utilizados 48 ratos *Wistar* (*Ratus norvegicus*), albinos, adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 180 e 220 gramas, fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IpeFarM-UFPB). Todos foram agrupados em gaiolas de polietileno, contendo seis animais em cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sem uso de qualquer medicamento, tendo livre acesso à ração (tipo *pellets*) e água. Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) sob o N° 1105/14, 1205/14 e 1005/14.

Os protocolos experimentais foram orientados pelas normas vigentes no Brasil, por obras de referência e ainda por padronização prévia realizada no Biotério do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarm-UFPB) (DINIZ, 2000; BRASIL, 2004; BRASIL, 2013). Os ratos *Wistar* selecionados foram divididos em quatro grupos: um grupo controle e três grupos tratados. Cada grupo foi formado por 12 animais, sendo 6 machos e 6 fêmeas. O grupo controle foi distribuído em duas caixas separando os animais por sexo, e a estes foram administrado água.

Cada grupo tratado foi distribuído da mesma maneira e receberam por gavagem a dose de 1000 mg/kg das emulsões de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*, respectivamente.

Após a administração das emulsões, a observação de parâmetros comportamentais por triagem farmacológica foi realizada nos intervalos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, seguindo o protocolo experimental padrão de comportamento descrito por Almeida, Falcão *et al.* (1999), Almeida e Oliveira (2006) e Mariz, Cerqueira *et al.* (2006) onde analisou-se a ocorrência de alterações no sistema nervoso central como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonias, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar. Do mesmo modo, foram avaliadas possíveis alterações no sistema nervoso autônomo como diarreia, constipação, defecação, micção, tônus muscular. Dessa forma, ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos é possível inferir uma relação com atividade no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA).

No período de 14 dias de observação ainda foram mensurados os seguintes parâmetros: evolução ponderal, consumo de água e alimentos e registro da letalidade. O consumo de água e comida para os animais foram avaliados diariamente desde as primeiras 24 horas após a administração da emulsão e, em seguida, uma vez por dia durante 14 dias. O peso dos animais foi verificado no dia 1 (basal) no 7º e 14º dia.

Ao final do período de observação, os animais foram anestesiados com xilazina/cetamina e eutanasiados por deslocamento cervical. As amostras de sangue foram coletadas por meio de plexo braquial para avaliação posterior dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

7.1.2 Análise Hematológica e Bioquímica

A coleta das amostras foi realizada através de sangria do plexo braquial, o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e em tubos com gel separador – Microtainer Becton Dickson® – que foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 RPM, obtendo o soro para determinação dos parâmetros bioquímicos. Após o final dos períodos de administração, as amostras de sangue foram obtidas por análise de hematologia e bioquímica do soro. Para a análise hematologia os leucócitos (LEU), eritrócitos (ERY), hemoglobina (HGB), hematócrito (HEM) volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina

corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), plaquetas (PLT), linfócitos (LIM), hematócrito (HEM), monócitos (MON), neutrófilos (NEUT), eosinófilos (EOS), foram determinados por meio de um analisador de hematologia automático ABX ABC Vet Hematologia Analyzer - Horiba Abx, Japão-2005.

Os ensaios Bioquímicos foram realizados utilizando um analisador de bioquímica automático Roche-Hitachi 7180 - Japão para os seguintes parâmetros: ureia, cálcio, ácido úrico, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), creatinina (Cr), colesterol total (TCHO), triglicéridos (TG), proteína total (TP), gama-glutamil transferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH) (Brasil 2013, Wang, Li et al. 2014).

Para análise estatística dos resultados, foi utilizado o Teste “t” Mann-Whitney não pareado, utilizando o Software GraphPad Prism 6.0 sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram valores de $p < 0,05$.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1 Estudo de toxicidade aguda não clínica

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias (BRASIL, 2013). A toxicidade aguda é um estudo inicial realizado para fornecer informação sobre a possível atividade tóxica de uma substância, como também, para designar doses em estudos futuros de toxicidade subcrônica e crônica com animais (UKWUANI, ABUBAKAR *et al.*, 2012). O presente trabalho realizou estudo de toxicidade aguda das emulsões de *E. globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa), uma vez que, não devem apresentar risco de toxicidade e devem apresentar segurança para consumo humano garantindo a sua utilização segura como medicamento (ALVES *et al.*, 1999; ZUNINO, 2007; BALOGUN 2014; WANG, 2014)

7.2.2 Avaliação da triagem farmacológica comportamental

A triagem farmacológica comportamental foi realizada, após a administração de uma única dose de 1000 mg/kg das emulsões, durante um período de 4 horas, através da observação de possíveis alterações que indicassem atividade farmacológica no sistema nervoso central ou autônomo.

Os animais tratados com *E. globulus* apresentaram nos primeiros 30 minutos irritabilidade, hiperatividade, ambulação, limpeza, levantar e piloereção representados pelo ato de cavar e espalhar a serragem da caixa e esfregar “o pescoço” no chão. Após uma hora foi observado diminuição dos efeitos, e os animais restabeleceram as características iniciais ou de normalidade. Os animais tratados com a emulsão de *S. terebinthifolius* demonstraram hiperatividade e irritabilidade intensa nos primeiros 30 minutos, condição que sofreu declínio durante o tempo, e cessou após 3 horas. A piloereção iniciou com 30 minutos e terminou após 1h. Outros comportamentos foram evidenciados nos primeiros 30 minutos, como limpeza de forma intensa, ação de levantar e escalar. De modo semelhante, os

animais tratados com a emulsão de *P. amboinicus* apresentaram hiperatividade, ambulação, limpeza e levantamento intenso em até meia hora.

A observação clínica não mostrou sinais de toxicidade tais como alterações clínicas e comportamentais graves, ao comparar as emulsões de *E. globulus*, *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus* com o grupo controle (SILVA, 2016).

Apesar da predominância de sinais indicativos de ação estimuladora no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA), tais alterações neurológicas podem ser consideradas como inespecíficas, pois podem estar relacionadas com o desconforto após a administração da emulsão.

7.2.3 Evolução ponderal

O acompanhamento da evolução de peso dos animais tratados, por via oral, com as emulsões de *E. globulus* (EEg), *S. terebinthifolius*-folha (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa), na dose de 1000mg/kg, está descrito na Tabela 1. Para cada emulsão foram preparadas 100 mL contendo 28,8% de óleo essencial, 7,2% de tensoativo e 64% de água. Foram observadas variações significativas de ratos *wistar*, machos e fêmeas, tratados com a emulsão de *E. globulus*, quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Os grupos dos machos e fêmeas tratados apresentaram um ganho de peso significativo em relação ao controle, ambos nos primeiros sete dias do experimento. Não foi observada nenhuma alteração significativa na evolução ponderal de ratos *Wistar* machos e fêmeas tratados com a emulsão de *S. terebinthifolius*. Entretanto, ocorreram variações significativas na evolução ponderal tanto em ratos machos como em fêmeas tratadas com a emulsão de *P. amboinicus* em comparação aos seus respectivos grupos controle.

A avaliação ponderal dos animais mostrou que, os animais tratados com a dose de 1000 mg/kg da emulsão de *E. globulus*, apresentaram alterações significativas comparadas aos controles, apenas nos primeiros sete dias do ensaio. No entanto, nos últimos sete dias de experimento, fêmeas e machos de grupos controle e tratados ganharam peso de forma semelhante e, portanto, a partir deste parâmetro, não se pode inferir uma toxicidade oral aguda. Os animais tratados com a emulsão contendo *S. terebinthifolius* (folha) não mostraram nenhuma alteração estatisticamente significativa. Neste estudo, as fêmeas

tratadas com a dose de 1000 mg/kg da emulsão de *P. amboinicus* não tiveram um aumento de peso semelhante ao seu grupo controle nos últimos sete dias do ensaio. Este resultado pode ser decorrente de uma assimilação e absorção de nutrientes comprometidas em consequência de uma perturbação gástrica (AMENYA *et al.*, 2014). Além disso, o grupo dos machos tratados com a dose de 1000 mg/kg não apresentou variações de peso em relação ao controle em nenhum momento. No entanto, avaliando esse parâmetro, não se pode inferir uma toxicidade oral aguda.

Tabela 1 - Evolução ponderal de ratos *Wistar*, machos e fêmeas, tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões de *E.globulus*(EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda.

Sexo/período (em semanas)	Controle	EEg	ESt-folha	EPa
Machos 1ª Semana	24,17 ± 14,33	56,83 ± 14,77*	35,33 ± 14,04	17,75±43,55*
Machos 2ª Semana	53,00 ± 8,60	49,50 ± 22,18	36,33 ± 15,60	24,75±42,43
Fêmeas 1ª Semana	23,00 ± 1,55	24,33 ± 4,96	18,92 ± 5,92	18,17±5,27
Fêmeas 2ª Semana	32,00 ± 16,67	25,33 ± 24,1	20,50 ± 5,96	15,33±4,46*

Os valores estão expressos em média ± S.D (n=6). Teste “t” Mann-Whitney.*p<0,05

Fonte: Dados da pesquisa

7.2.4 Consumo de água e ração

A observação do consumo de água e ração é um indicador importante, pois permite avaliar a toxicidade de substância, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais (ROCHA *et al.*, 2012 SANTANA *et al.*, 2014)

A ingestão de água e ração foi avaliada diariamente durante o tratamento agudo com as emulsões em estudo conforme Tabela 2. Não foi observada nenhuma alteração significativa tanto para consumo de água quanto de ração nos animais que receberam a dose de emulsão de *E. globulus* e *S. terebinthifolius*. No entanto, os animais machos tratados com a emulsão de *P. amboinicus* reduziram significativamente o consumo de água e ração, e as fêmeas mostraram uma menor ingesta de ração, em relação ao controle demonstrando sinais de toxicidade.

A ingestão de água e de nutrientes são parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com fins terapêuticos, pois são essenciais para o bom funcionamento do sistema fisiológico dos animais e, conseqüentemente, para uma adequada resposta à droga testada, já que condições nutricionais impróprias podem acarretar deficiência do organismo (STEVENS & MYLECRAINE, 1994).

Tabela 2 - Consumo de água e ração de ratos *Wistar*, machos e fêmeas, tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões de *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda.

Sexo/consumo	Controle	EEg	ESt-folha	EPa
Machos				
Consumo Água (mL)	207,9 ± 18,76	202,5 ± 27,26	198,2 ± 20,03	118,80 ± 26,12*
Consumo Ração (g)	132,9 ± 19,06	133,7 ± 14,50	132,7 ± 8,35	71,68 ± 16,45*
Fêmeas				
Consumo Água (mL)	180,4 ± 18,27	197,9 ± 20,94	192,7 ± 27,87	173,80 ± 17,47
Consumo Ração (g)	113,2 ± 14,29	115,8 ± 11,39	110,8 ± 18,13	97,49 ± 8,09*

Os valores estão expressos em média ± S.D (n=6). Teste “t” Mann-Whitney. *p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa

7.2.5 Parâmetros bioquímicos

7.2.5.1 Emulsão com *E. globulus* (EEg)

As análises do sangue dos animais tratados e controles evidenciaram a ausência de alterações entre estes grupos sobre a maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados após o período experimental de 14 dias (Tabela 3). Porém, variações significativas foram detectadas em determinados parâmetros, como: AST, creatinina, triglicerídeos, cálcio e ureia.

Os animais tratados com a emulsão EEg apresentaram uma pequena diferença nos níveis de transaminase quando comparado com o grupo controle, no entanto, este valor encontra-se dentro dos valores de referência descritos por BRANCO (2011). Os níveis de transaminases, como ALT, AST e GGT são utilizados como indicadores de problemas

hepáticos, (BRANDT *et al.*, 2009). Dessa maneira, de acordo com resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar que a emulsão EEg não promoveu lesões hepáticas.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. Amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda.

	Controle	EEg	ESt-folha	EPa
Machos				
Proteína (g/dL)	5,00 ± 0,33	5,15 ± 0,30	5,55 ± 0,34*	5,67 ± 0,29*
ALT (U/L)	49,02 ± 3,28	49,02 ± 21,15	52,18 ± 11,81	68,83 ± 14,29
AST (U/L)	88,14 ± 22,10	86,85 ± 20,40	102,80 ± 16,38	89,90 ± 6,61
GGT (U/L)	3,60 ± 3,21	4,50 ± 2,07	5,40 ± 1,67	8,00 ± 1,83
LDH (U/L)	708,70 ± 322,90	706,30 ± 288,40	665,80 ± 173,00	528,60 ± 85,30
Colesterol (mg/dL)	78,34 ± 19,71	69,67 ± 13,95	55,52 ± 9,40	67,30 ± 10,28
Triglicerídeos (mg/dL)	91,00 ± 37,30	94,20 ± 31,60	41,33 ± 14,81*	48,25 ± 16,98
Cálcio (mg/dL)	7,52 ± 0,52	7,40 ± 0,74	5,88 ± 0,26*	8,30 ± 0,29*
Ácido Úrico (mg/dL)	1,26 ± 0,30	1,12 ± 0,22	1,03 ± 0,23	0,80 ± 0,20*
Ureia (U/L)	40,95 ± 3,93	42,23 ± 6,17	46,17 ± 6,99	45,58 ± 7,52
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,37 ± 0,03*	0,40 ± 0,02*
Fêmeas				
Proteína (g/dL)	4,86 ± 0,18	5,18 ± 0,42	5,65 ± 0,19*	5,25 ± 0,39
ALT (U/L)	43,12 ± 7,78	47,53 ± 15,10	40,93 ± 7,11	39,09 ± 12,53
AST (U/L)	117,70 ± 29,80	91,48 ± 21,10	83,55 ± 15,84	106,70 ± 33,89
GGT (U/L)	6,40 ± 1,52	6,33 ± 2,66	4,00 ± 0,89*	6,25 ± 3,86
LDH (U/L)	1681 ± 761,80	921,30 ± 288,80*	820,3 ± 298,6	684,21 ± 80,4*
Colesterol (mg/dL)	56,60 ± 13,50	69,15 ± 12,10	78,17 ± 15,70	75,45 ± 8,46*
Triglicerídeos (mg/dL)	69,40 ± 11,41	85,83 ± 39,80	120,0 ± 37,22*	68,67 ± 24,30
Cálcio (mg/dL)	7,94 ± 0,42	8,57 ± 1,41	7,27 ± 0,61	9,32 ± 0,45*
Ácido Úrico (mg/dL)	1,52 ± 0,30	1,25 ± 0,40	1,12 ± 0,31	1,53 ± 0,40
Ureia (U/L)	45,50 ± 7,84	45,95 ± 8,10	46,82 ± 6,29	49,09 ± 6,92
Creatinina (mg/dL)	0,55 ± 0,04	0,46 ± 0,08	0,45 ± 0,03*	0,45 ± 0,02*

Os valores estão expressos em média ± S.D (n=6). Teste “t” Mann-Whitney. *p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa

O colesterol e o lactato desidrogenase (LDH) dos animais tratados com emulsão EEg, não mostraram diferença significativa.

Na administração da emulsão EEg ocorreu um aumento da dosagem de triglicerídeos (TG) dos animais tratados em relação ao controle, no entanto, estando dentro dos valores normais de referência estabelecidos para ratos. Os TG são a principal forma de armazenamento dos lipídeos no tecido adiposo e seu aumento é um problema, devido ser um agente causador de hiperlipidemias e problemas cardiovasculares (PEREIRA, 2008).

A análise do cálcio no soro de machos tratados com EEg mostrou-se inferior em relação ao seu respectivo controle, sendo que este tipo de resultados não tem conotação patológica. Além disso, as fêmeas apresentaram valores superiores em relação ao controle.

A análise de alguns biomarcadores de lesão néfron-funcional, como ureia, ácido úrico e creatinina no presente estudo (LEMAIRE, GODEFROY *et al.*, 2005), mostrou que a dosagem da ureia do grupo de animais tratados com OEEg foi superior quando comparada ao grupo controle. Apesar do elevado valor de ureia está relacionado com insuficiência renal, o resultado encontra-se dentro dos padrões de referência (SALASANTI, SUKANDAR *et al.*, 2015). Além disso, os níveis de ácido úrico e creatinina do grupo tratado no presente estudo foram baixos em relação ao grupo de controle. Segundo estudos de SILVA (2016), baixos valores indicam ausência de lesão tecidual nos rins.

7.2.5.2 Emulsão com *S. terebinthifolius*-folha (ESt-folha)

Durante a análise dos parâmetros bioquímicos de *S. Terebinthifolius* (Tabela 3) foram encontradas alterações significativas nos parâmetros, proteína total, triglicérides, cálcio, creatinina para machos e fêmeas e GGT para as fêmeas. No entanto, estas alterações não têm significado clínico, porque estão dentro dos valores de referência (GIKNIS & CLIFFORD, 2006; BRANCO *et al.*, 2011).

Os parâmetros ALT e AST não demonstraram alterações estatísticas em relação ao grupo controle. No entanto, um aumento da quantidade de ALT no sexo masculino foi evidente, mas esse aumento não tem significado clínico, porque os valores estão dentro dos limites normais descritos por Castello Branco e colaboradores (2011).

De acordo com estudos realizados pelo Yuet Ping (2013), as alterações significativas na ALT e AST, em ambos os sexos masculino e feminino, não afeta a função de hepatócitos nos ratos. Algumas enzimas e proteínas podem ser utilizadas como indicadores de problemas hepáticos, tais como ALT, AST, GGT e bilirrubina (BRANDT *et al.*, 2009). No presente estudo houve diminuição significativa na quantidade de GGT (gama glutamiltransferase) para as fêmeas tratadas com a emulsão *S. terebinthifolius*, tal alteração foi considerada ainda dentro dos valores normais.

Embora a enzima GGT não ser tão específica, pode ser encontrada no pâncreas e nos rins, onde o aumento desse marcador não desencadeia perturbações nestes órgãos, a menos que haja um dano hepático em curso (MOTTA, 2009). De acordo com estudos demonstrados por Tennant e Center (2008), mesmo a GGT estando presente em muitos tecidos, o aumento da sua atividade são observados principalmente em enfermidades hepáticas.

Nos animais tratados com a emulsão de *S. terebinthifolius* foram observadas alterações significativas nos parâmetros triglicerídeos. No sexo masculino, houve um decréscimo, enquanto que as fêmeas houve um aumento deste parâmetro. Portanto, as alterações nos parâmetros de triglicerídeos, sugerem que esta emulsão tem um efeito sobre o metabolismo dos lipídeos. As alterações na concentração destes parâmetros podem proporcionar informações importantes no que diz respeito ao metabolismo lipídico e a predisposição para aterosclerose e doença cardíaca (YAKUBU, 2008).

O aumento dos níveis de ureia observado no grupo tratado quando comparado com o controle, poderá estar associado à disfunção renal provavelmente pelo mecanismo de filtração renal, como também, interferiu na capacidade do rim de excretar este metabolito como sugerido por Crook (2006). Os níveis de ureia podem ser alterados devido ao desequilíbrio da função renal, catabolismo proteico, estado de hidratação do organismo e sangramento intestinal (MUKINDA e EAGLES, 2010; RIBEIRO, 2015).

Em animais tratados com as emulsões de *S. terebinthifolius* observou-se a diminuição nos níveis séricos de creatinina em machos e fêmeas. Esse achado embora significativo, não foi sugestivo de quadro de toxicidade, uma vez que o aumento na concentração de creatinina pode ser relacionado a um problema de maior gravidade devido à redução na taxa de depuração renal e consequente elevação sérica de creatinina (KANEKO, 2008; RAVEL, 1995; DINIZ, 2000). A concentração de creatinina é um indicador clínico importante, desde a queda da filtração glomerular, com elevação subsequente da taxa de creatinina plasmática o que implica em perda da função renal (BERNE & LEVY, 2006).

7.2.5.3 Emulsão com *Plectranthus amboinicus* (EPa)

Os animais tratados com a *P. amboinicus* apresentaram alterações consideradas significativas no tocante aos parâmetros referentes as proteínas totais, ácido úrico, colesterol, cálcio, LDH e creatinina em relação ao grupo controle. Entretanto, essas alterações não apresentaram significância clínica, pois os níveis avaliados ficaram dentro dos valores de referência considerados normais (GIKNIS & CLIFFORD, 2006; BRANCO *et al.*, 2011). O perfil bioquímico dos animais tratados após o período experimental de 14 dias está descritas na Tabela 3.

Nos animais tratados com as emulsões de *P. amboinicus* observou-se uma diminuição na quantidade de creatinina para os machos e fêmeas. Demonstrando que apesar de significativo, este resultado não foi sugestivo de toxicidade, visto que valores aumentados de creatinina podem estar relacionados a um aumento na ingestão de aminoácidos e formação de creatina fosfato hepática (BORBA, 2011) e/ou desidratação (TRABELSI *et al.*, 2011).

Os níveis de colesterol se mostraram aumentados em fêmeas tratadas com a emulsão de *P. amboinicus*, quando comparados ao controle. O aumento do colesterol é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (PEREIRA, 2008). Este aumento pode ser explicado por um estresse ocasionado pela administração da emulsão, resultando em alterações de cunho metabólico (CUNHA *et al.*, 2009). Porém estes valores corroboram com as pesquisas realizadas por Giknis & Clifford (2006).

7.2.6 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos obtidos dos animais tratados com EEg mostraram alterações nas hemácias, hemoglobinas, hematócritos, leucócitos monócitos e neutrófilos. Nos animais tratados com a ESt, apresentaram alterações significativas nas hemácias, hemoglobina, hematócrito, linfócitos e CHCM. Em contrapartida, os animais que receberam a dose da EPa sofreram alterações em hemácias, hemoglobina, hematócrito e leucócitos. As alterações hematológicas obtidas após o período experimental de 14 dias

estão descritas na Tabela 4 e 5. Os grupos tratados não revelaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

O sistema hematopoiético é uma das partes mais sensíveis do corpo para sofrer alterações por substâncias tóxicas, sendo, portanto, considerado um parâmetro essencial e imprescindível para avaliar o perfil fisiológico e patológico em humanos e animais (LI *et al.*, 2010).

A emulsão contendo OEEg induziu ao aumento na contagem de hemácias do grupo de fêmeas tratadas em relação a seu controle, e isso pode sugerir uma policitemia (POITOUT-BELISSENT e McCARTNEY, 2010), no entanto, segundo Branco e colaboradores (2011), este resultado encontra-se dentro do padrão de referência para os ratos, não inferindo em quadro de toxicidade. A dosagem de hemoglobina e hematócrito de machos tratados, também mostraram-se elevados em relação a seus respectivos controles, porém estes valores foram considerados com normais (MELO *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Parâmetros Hematológicos obtidos do plasma dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda.

	Controle	EEg	ESt-folha	EPa
Machos				
Hemácia ($10^6/\mu\text{L}$)	$7,22 \pm 0,68$	$8,00 \pm 0,60$	$9,14 \pm 0,34^*$	$8,98 \pm 0,32^*$
Hemoglobina (g/dL)	$12,68 \pm 0,87$	$14,75 \pm 0,55^*$	$15,10 \pm 0,52^*$	$14,88 \pm 0,58^*$
Hematócrito (%)	$41,63 \pm 2,25$	$47,52 \pm 2,04^*$	$49,55 \pm 1,48^*$	$49,15 \pm 1,65^*$
VCM (fL)	$57,90 \pm 3,53$	$59,55 \pm 3,06$	$54,20 \pm 0,40$	$54,73 \pm 1,03$
HCM (Pg)	$17,65 \pm 1,28$	$18,48 \pm 1,10$	$16,52 \pm 0,16$	$16,58 \pm 0,20$
CHCM (g/dL)	$30,43 \pm 0,57$	$31,03 \pm 0,38$	$30,47 \pm 0,13$	$30,25 \pm 0,26$
Fêmeas				
Hemácia ($10^6/\mu\text{L}$)	$7,70 \pm 0,17$	$8,52 \pm 0,79^*$	$8,09 \pm 0,49$	$8,02 \pm 0,63$
Hemoglobina (g/dL)	$13,60 \pm 0,91$	$14,10 \pm 0,58$	$14,78 \pm 0,41$	$14,32 \pm 0,52$
Hematócrito (%)	$44,08 \pm 2,17$	$46,24 \pm 0,62$	$46,13 \pm 1,78$	$44,85 \pm 2,83$
VCM (fL)	$57,28 \pm 2,71$	$56,90 \pm 1,26$	$57,12 \pm 1,36$	$56,00 \pm 2,01$
HCM (Pg)	$17,66 \pm 1,08$	$17,36 \pm 0,78$	$18,33 \pm 0,78$	$17,88 \pm 1,03$
CHCM (g/dL)	$30,84 \pm 0,64$	$30,52 \pm 1,06$	$32,07 \pm 0,67^*$	$32,00 \pm 1,28$

Os valores estão expressos em média \pm S.D (n=6). Teste “t” Mann-Whitney. *p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa

Os animais machos tratados com as emulsões de *S. terebinthifolius* e *P. amboinicus*, mostraram valores de hemácias que aumentaram de forma significativa. Além disso, pode-se observar que o quantitativo de hemácias varia principalmente em função do sexo. Essa

diferença entre os sexos se deve aos níveis de testosterona que estimulam a medula óssea na produção de eritrócitos (MOTTA, 2009; JAIJOY, 2011).

Tabela 5 - Parâmetros Hematológicos obtidos do plasma dos ratos tratados com a dose de 1000 mg/kg das emulsões contendo o óleo essencial *E.globulus* (EEg), *S. terebinthifolius* (ESt-folha) e *P. Amboinicus* (EPa), por via oral, durante o ensaio de toxicidade aguda.

	Controle	EEg	ESt-folha	EPa
Machos				
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$9,98 \pm 1,87$	$10,12 \pm 1,75$	$12,27 \pm 2,13$	$10,88 \pm 1,19$
Neutrófilos (%)	$25,75 \pm 2,50$	$27,17 \pm 6,62$	$30,17 \pm 5,00$	$32,50 \pm 5,68$
Eosinófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,82$	$0,17 \pm 0,17$	$0,0 \pm 0,0$
Linfócitos (%)	$70,25 \pm 3,78$	$65,67 \pm 8,33$	$61,67 \pm 4,50^*$	$62,75 \pm 7,24$
Monócitos (%)	$3,50 \pm 2,08$	$6,33 \pm 2,73$	$7,00 \pm 2,28$	$4,75 \pm 2,22$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$673,00 \pm 431,00$	$750,50 \pm 387,25$	$733,00 \pm 279,00$	$777,80 \pm 332,50$
Fêmeas				
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$6,34 \pm 0,86$	$10,86 \pm 2,43^*$	$8,50 \pm 3,64$	$8,27 \pm 1,43^*$
Neutrófilos (%)	$31,67 \pm 6,03$	$24,80 \pm 3,19^*$	$26,17 \pm 4,36$	$23,83 \pm 5,84$
Eosinófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,00 \pm 0,00$	$0,33 \pm 0,52$	$0,0 \pm 0,0$
Linfócitos (%)	$64,00 \pm 6,00$	$68,40 \pm 2,30$	$69,50 \pm 4,89$	$73,33 \pm 4,88$
Monócitos (%)	$4,33 \pm 0,58$	$6,80 \pm 2,05^*$	$4,00 \pm 1,80$	$2,83 \pm 1,33$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$597,40 \pm 464,00$	$784,00 \pm 154,79$	$830,00 \pm 78,91$	$561,20 \pm 384,50$

Os valores estão expressos em média \pm S.D (n=6). Teste “t” Mann-Whitney. *p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa

O nível de CHCM nos animais machos tratados com a emulsão de *S. terebinthifolius* aumentou de forma significativa, porém foi considerado dentro da normalidade, segundo os valores encontrados por GIKNIS e CLIFFORD (2006). Por outro lado, não foram observadas alterações deste parâmetro para os ratos tratados com a emulsão de *P. amboinicus*. Outros valores como, hemoglobina e hematócrito dos machos tratados tanto com a emulsão de *S. terebinthifolius* quanto com a emulsão de *P. amboinicus* sofreram alterações significativas, entretanto, essas alterações estão dentro dos valores de normalidade (GIKNIS e CLIFFORD, 2006; BRANCO *et al.*, 2011).

A contagem global de leucócitos e monócitos observados nas emulsões OEEg, estiveram elevadas para as fêmeas do grupo tratado em relação ao controle, fora dos valores normais (BRANCO *et al.*, 2011). Esse aumento acima dos valores fisiológicos no leucograma, (leucocitose), geralmente indica um processo reativo do organismo, caso esta contagem de leucócitos esteja muito elevada, pode se verificar uma extensão de sangue periférica com aspecto semelhante ao de leucemia, quadro denominado reação leucemóide

(HENRY, 2008). Este grupo de animais também mostrou redução de neutrófilos sugerindo que a diminuição na quantidade de neutrófilos tenha sido causada por momentos de estresse, onde ocorreu uma ligeira depressão da produção destas células (WOLFORD *et al.*, 1987; LORENZI, T.F., 2006), porém, tal redução está dentro do valor normal (BRANCO *et al.*, 2011).

Durante a análise da série branca, observou-se uma redução significativa no número de linfócitos dos machos tratados com a emulsão de *S. terebinthifolius*. Existem fatores que reduzem o número de linfócitos circulantes e, portanto, promovem a linfopenia. Os hormônios corticosteroides produzem essa disfunção, pois causam um aumento da destruição celular (linfocitólise). Os estados de estresse provocam semelhante efeito (LORENZI, 2006). Como citado na literatura, sugere-se que a diminuição na quantidade de linfócitos dos machos tenha sido causada por momentos de estresse, tendo em vista que as fêmeas não sofreram a mesma alteração. Outro parâmetro hematológico analisado foi à contagem diferencial de leucócitos, onde ocorreu aumento desse número de células em fêmeas no grupo tratado com a emulsão de *P. amboinicus*, enquanto que não houve alteração para os animais tratados com a *S. terebinthifolius*. A contagem elevada destas células, geralmente indica um processo reativo/infeccioso (MOTTA, 2009).

Após o tratamento agudo utilizando-se as emulsões contendo o óleo essencial obtido *E. globulus*, *S. terebinthifolius* (folhas) e de *P. amboinicus* na dose de 1000 mg/kg por via oral em ratos machos e fêmeas, constatou-se baixa toxicidade na dose referida, visto que, durante a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, os valores obtidos apresentaram alterações, porém encontram-se dentro dos valores considerados como de referência.

7.3 CONCLUSÃO

Os ensaios de toxicidade aguda realizados foram importantes para garantir a segurança e eficácia das emulsões OEEg, OEST (folha) e OEPA administradas por via oral e na dose 1000mg/kg. Os animais não apresentaram sinais significativos de toxicidade sobre os parâmetros ingestão de água e alimentos, evolução ponderal, hematológicos e bioquímicos em ratos wistar de ambos os sexos e o mesmo não levou a óbito os animais tratados. Dessa forma, os resultados obtidos na avaliação da toxicidade aguda demonstram que as referidas emulsões podem ser usadas de forma segura, uma vez que não induziu mudanças de importância clínica no perfil hematológico e bioquímico. Além disso, em função das alterações orgânicas observadas, sugere-se a continuidade dos estudos mediante a avaliação da toxicidade crônica das emulsões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os óleos essenciais de *E. globulus*, *S. terebinthifolius*-fruto, *S. terebinthifolius*-folha e *P. amboinicus* foram caracterizados quanto aos parâmetros físico-químicos (densidade, índice de refração, solubilidade, características organolépticas), como também, foi realizada a identificação dos constituintes químicos por cromatografia em fase gasosa.

A viabilidade de veiculação de óleos essenciais de *E. globulus*, *S. terebinthifolius*-fruto, *S. terebinthifolius* -folha e *P. amboinicus* em sistemas emulsionados foi demonstrada com a obtenção das emulsões. Além disso, os sistemas foram caracterizados quanto à estabilidade durante 180 dias, levando em consideração o índice de cremagem, pH, condutividade, teor dos marcadores além da obtenção do diagrama de fases delimitando as regiões de formação de emulsão, creme, loção e separação de fases.

Os estudos realizados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *ex vivo* foram satisfatórios, uma vez que os resultados comprovaram a viabilidade da utilização das formulações como antimicrobianos.

Os parâmetros evolução ponderal, hematológicos, bioquímicos dos ensaios de toxicidade aguda realizados nas emulsões contendo OEEg, OEST (folha) e OEPa na dose 1000mg/kg, demonstraram que podem ser utilizadas de forma segura.

Dessa forma, os sistemas emulsionados contendo óleo essencial de *E. globulus*, *S. terebinthifolius*-fruto, *S. terebinthifolius*-folha e *P. amboinicus* mostraram ser exequíveis. Por conseguinte, as emulsões contendo *P. amboinicus* demonstraram ser mais vantajosas, por apresentarem os melhores resultados em relação à atividade antimicrobiana e a toxicidade.

Como perspectivas propõem-se o desenvolvimento do produto final como também, o desenvolvimento de emulsões contendo a mistura dos três óleos essenciais de *E. globulus*, *S. terebinthifolius*, *P. amboinicus*. Além disso, a realização do estudo de estabilidade de acordo com o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade publicado na RDC N° 1/2005, determinação do mecanismo de ação das formulações, estudo de toxicidade crônica e ensaio de sensibilidade dérmica.

REFERÊNCIAS

- AAZZA, SMAIL, BADIÂ LYOUSSI, MARIA G. MIGUEL. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* v.16, n. 9, p. 7672-7690, 2011.
- ABDULLAH, G. Z., M. F. ABDULKARIM, I. M. SALMAN, O. Z. AMEER, M. CHITNENI, E. S. MAHDI, M. F. YAM, S. HAMEEM, M. BASRI, M. A. SATTAR. Stability studies of nano-scaled emulsions containing ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Drug Delivery* v.3, p.1, 2011.
- ABREU MATOS, F. J.. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**, Editora UFC, p. 2-11, 2002.
- ADORJAN, BARBARA. *Biological properties of essential oils*. **Diss. uniwienn**, 2010.
- AGHAMIRIAN, MOHAMMAD REZA, e SEYED AMIR GHIASIAN. Onychomycosis in Iran: epidemiology, causative agents and clinical features. *Japanese Journal Society for Medical Mycology* v. 51, n.1, p. 23-29, 2010.
- AGRA, MARIA DE FÁTIMA, PATRÍCIA FRANÇA DE FREITAS, JOSÉ MARIA BARBOSA-FILHO. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AHMAD, A., KHAN, A., AKHTAR, F., YOUSUF, S., XESS, I., KHAN, L. A., MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* v. 30, n.1, p. 41-50, 2011.
- AHMAD, J., AMIN, S., KOHLI, K., MIR, S. R. Construction of Pseudoternary Phase Diagram and Its Evaluation: Development of Self-Dispersible Oral Formulation. *International Journal of Drug Development and Research*, v. 1, p. 1-11 2013.
- ALBUQUERQUE, ULYSSES P. Three new varieties in *Ocimum L. (Lamiaceae)*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 42, n.1, p 1-7, 1999.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, p.430-467, 2013.
- ALMEIDA FREIRES, I., ALVES, L. A., DE CARVALHO JOVITO, V., CASTRO, R. D. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero Candida. *Revista Odontológica do Brasil Central* v. 20, n. 52, p. 1-9, 2011.

ALMEIDA, R. AND T. OLIVEIRA. **Triagem Farmacológica Comportamental**. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.131-137, 2006.

ALMEIDA, R., A. FALCÃO, R. DINIZ, L. QUINTANS-JÚNIOR, R. POLARI, J. BARBOSA-FILHO, M. AGRA, J. DUARTE, C. FERREIRA AND A. ANTONIOLLI. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 80, p. 72-76, 1999.

ALVES, M. P., FUNCK, J. A. B., BITTENCOURT, C. F., & SILVA, M. A. S.. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas não iônicas para incorporação de fármacos. **Revista Pharmaceutical Technological (Ed. port.)** v. 3, n. 2, p. 40-5, 1999.

AMAKURA, Y., M. YOSHIMURA, N. SUGIMOTO, T. YAMAZAKI e T. YOSHIDA. Marker constituents of the natural antioxidant *Eucalyptus* leaf extract for the evaluation of food additives. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry** v. 73, n. 5, p.1060-1065, 2009.

AMENYA, H. Z., GATHUMBI, P. K., MBARIA, J. M., THAIYAH, A. G., THOITHI, G. N.. Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 154, n. 3, p. 593-599, 2014.

AMORIM, MMR DE, LUIZ CARLOS SANTOS. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*): ensaio clínico randomizado. **RBGO** v. 25, n.2, p. 95-102, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1ª ed. Brasília: ANVISA, p.113-117, 2004.

ARAÚJO, A. J. G., BASTOS, O. M. P., SOUZA, M. A. J., DE OLIVEIRA, J. C. . Onicomioses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. **Anais Brasileiro Dermatologia** v. 78, n. 4, p. 445-455, 2003.

ARAÚJO, F., C. RUAN, A. BATISTA SILVA, E. CLEMENTINO TAVARES, E. P. DA COSTA E S. RIOS MARIZ. Perfil e prevalência de uso de plantas medicinais em uma unidade básica de saúde da família em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 35, n. 2, p. 233-238, 2014.

ARENAS, R. E J. RUIZ-ESMENJAUD. Onicomiose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento Onychomycosis in childhood: a current perspective with emphasis on the review of treatment. **Anais Brasileiro Dermatologia** v. 79, n. 2, p. 225-232, 2004.

ARUMUGAM, GREETHA, MALLAPPA KUMARA SWAMY, RANI SINNIHAH. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. **Molecules** v. 21, n.4, p. 369, 2016.

AULTON, M. E. E G. G. ORTEGA. **Delineamento de formas farmacêuticas**, Artmed, p. 667, 2008.

AULTON, M. E. **Suspensões e Emulsões** in Delineamento de Formas Farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, p. 245-263, 2005.

AZEEZ, O. T., EJETA, K. O., FRANK, E. O., GERALD, N. E. Effects of antioxidants on the oxidative stability of vegetable oil at elevated temperature. **International Journal of Applied Science and Technology** vol. 3, n. 5, p. 1-9, 2013.

AZEVEDO, C., Z. QUIRINO E R. BRUNO. Pharmacobotanical study of the aerial parts of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 17, n.1, p. 26-35, 2015.

AZMIR, J., I. ZAIDUL, M. RAHMAN, K. SHARIF, A. MOHAMED, F. SAHENA, M. JAHURUL, K. GHAFOR, N. NORULAINI, A. OMAR. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering** v.117, n 4, p. 426-436, 2013.

BACHIR, R. G. E M. BENALI. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v. 2, n. 9, p. 739-742, 2012.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. D. L. D., SILVA, F. M. D., RESSEL, L. B.. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-9, 2011.

BALBINO, EVELIN E., MURILO F. DIAS. Pharmacovigilance: A step towards the rational use of herbs and herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.

BALOGUN, S. O., DA SILVA, I. F., COLODEL, E. M., DE OLIVEIRA, R. G., ASCÊNCIO, S. D., DE OLIVEIRA MARTINS, D. T.. Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.-Hil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 157, p. 285-291, 2014.

BARBOSA, L. C. A., A. J. DEMUNER, A. D. CLEMENTE, V. F. D. PAULA, F. M. D. ISMAIL. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* raddi. **Química Nova** v. 30, p. 1959-1965, 2007.

BASSANI, V., O. GONZÁLES, P. PETROVICK. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica** v. 1, n. 1, p. 14-17, 2013.

BEN ARFA, A., COMBES, S., PREZIOSI-BELLOY, L., GONTARD, N., CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology** v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BENDAOUD, H., M. ROMDHANE, J. P. SOUCHARD, S. CAZAUX, J. BOUAJILA. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science** v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.

BERNARDI, D. S., PEREIRA, T. A., MACIEL, N. R., BORTOLOTO, J., VIERA, G. S., OLIVEIRA, G. C., ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of nanobiotechnology** v. 9, n. 1, p. 1, 2011.

BERNE, R. M., B. M. KOEPPEN AND B. A. STANTON. **Berne & Levy Physiology**, Elsevier Brazil, 2006.

BHATTARAM, V. A., U. GRAEFE, C. KOHLERT, M. VEIT, H. DERENDORF. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine** v. 9, p. 1-33, 2002.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, p. 1-5 2009.

BIZZO, HUMBERTO R., ANA MARIA C. HOVELL, CLAUDIA M. REZENDE. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova** v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORBA, A. J. D., ROCHA, M. G. M., SILVA, M. F. D., TIBÚRCIO, D. T. D. S., PEREIRA, S. A. D. L., REIS, L. C. D., & THEDEI JÚNIOR, G. . Low-carbohydrate diet used for weight loss induces obesity in rats. **Revista de Nutrição** 24.4: 519-528, 2011.

BORGES, A. M., J. PEREIRA, M. G. CARDOSO, J. A. ALVES E E. M. P. LUCENA. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** v. 14, p. 656-665, 2012.

BORG-VON ZEPPELIN, M., L. KUNZ, R. RÜCHEL, U. REICHARD, M. WEIG, U. GROß. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **Journal of antimicrobial chemotherapy** v. 60, n. 2, p. 424-428, 2007.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L., S. SLIMANI, K. MADANI. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. **Industrial Crops and Products** v. 41, p. 85-89, 2013.

BOURGEOIS, G. P., J. A. CAFARDI, K. SELLHEYER, A. A. ANDEA. Disseminated *Fusarium* originating from toenail paronychia in a neutropenic patient. **Cutis; cutaneous medicine for the practitioner** v. 85, n. 4, p. 191, 2010.

BOWMAN, SHAUN M., AND STEPHEN J. FREE. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays** v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRANCO, A. C. D. S. C., DINIZ, M. D. F. F. M., DE ALMEIDA, R. N., SANTOS, H. B., DE OLIVEIRA, K. M., DO AMARAL RAMALHO, J., DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

BRANDT, A. P., OLIVEIRA, L. F. S. D., FERNANDES, F. B., & ALBA, J.. Evaluation of prospective hypocholesterolemic effect and preliminary toxicology of crude extract and decoction from *Vitex megapotamica* (Spreng) *Moldenke* (V. *montevidensis* Cham.) in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 19, n.2, p. 388-393, 2009.

BRASIL. "**Farmacopéia Brasileira 2010**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, vol.1 5ed., p. 523, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. D.O.U., 18. mar., 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução - RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de março de 2004, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**., p. 3-12, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC Nº 13, de 14 de março de 2013**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação e Produtos Tradicionais Fitoterápicos, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

CARLINI, E. A., J. M. DUARTE-ALMEIDA, R. TABACH. Assessment of the Toxicity of the Brazilian Pepper Trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and

Myracrodruon urundeuva Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research** v. 27, n. 5, p. 692-698, 2013.

CARNEIRO, F. M., M. J. P. DA SILVA, L. L. BORGES, L. C. ALBERNAZ, J. D. P. COSTA. Tendências dos estudos com plantas medicinais no brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** (ISSN 2238-3565) v. 3, n. 2, p. 44-75, 2015.

CARVALHO FILHO, J. L. S., A. F. BLANK, P. B. ALVES, P. A. EHLERT, A. S. MELO, S. C. CAVALCANTI, M. D. F. ARRIGONI-BLANK, R. SILVA-MANN. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

CARVALHO, M., A. MELO, C. ARAGÃO, F. RAFFIN, T. MOURA. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CASAGRANDE, R., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI JR, W. A., VICENTINI, F. T., RAFAEL, J. A., FONSECA, M. J. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. **Química Nova** v. 32, n.7, p. 1939-1942, 2009.

CASTELI, V. C., C. C. MENDONÇA, I. C. L. DA SILVA, K. A. RODRIGUES, M. A. L. DE CAMPOS, S. R. P. MACHADO. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Scientiarum. Health Sciences** v. 30, n.2, p. 121-128, 2008.

CHANG, J.-M., C.-M. CHENG, L.-M. HUNG, Y.-S. CHUNG, R.-Y. WU. Potential use of *Plectranthus amboinicus* in the treatment of rheumatoid arthritis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 7, n. 1, p. 115-120, 2010.

CHARLES, D. J. E J. E. Simon. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v. 115, n. 3, p. 458-462, 1990.

CHAVAN, PRADNYA S., AND SANTOSH G. TUPE. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control** v. 46, p. 115-120, 2014.

CHEN, N., ZHAO, M., SUN, W., REN, J., CUI, C. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate. **Food Research International** v. 52, n.1, p. 26-32, 2013.

CHEN, W., AND A. M. VILJOEN. Geraniol - a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany** v. 76, n.4, p. 643-651, 2010.

CHIU, Y.-J., T.-H. HUANG, C.-S. CHIU, T.-C. LU, Y.-W. CHEN, W.-H. PENG, C.-Y. CHEN. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2012.

CLEELAND L, SQUIRES E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: Lorian VMD. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, p.739-788, 1991.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2º ed. Wayne Ed., 2002.

COLE, E. R., R. B. D. SANTOS, V. LACERDA JÚNIOR, J. D. L. MARTINS, S. J. GRECO, A. CUNHA NETO. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 45, p. 821-828, 2014.

COMAS, D., J. WAGNER E M. TOMÁS. Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein–lecithin interaction. **Food Hydrocolloids** v. 20, n. 7, p. 990-996, 2006.

CORRÊA, J. B., A. SCHNEIDER, A. CAVINATTO, C. COLET, L. VIERO AND I. T. S. GEHRKE. Rendimento do óleo essencial das folhas e frutos de uma espécie da família *anacardiaceae*. **Salão do Conhecimento** v. 1, p. 1, 2013.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 93, p. 366-376, 2015.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 250-272, 1994.

CRAGG, GORDON M., AND DAVID J. NEWMAN. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology** v. 100, n.1, p. 72-79, 2005.

CROOK, M. **Clinical chemistry & metabolic medicine**, Hodder Arnold London, 2006.

CUNHA, L. C., AZEREDO, F. S., MENDONÇA, A. C., VIEIRA, M. S., PUCCI, L. L., VALADARES, M. C., DE SOUZA, R.. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 19, n. 2, p. 403-411, 2009.

CZUB, JACEK, AND MACIEJ BAGINSKI. Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. **Biophysical Journal** v. 90, n.7, p. 2368-2382, 2006.

ĐAKOV, T. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. **Czech Journal of Food Sciences** 29.3: 277-284, 2011.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, p. 80-101, 2011.

DANELUTI, ANDRÉ LUIS MÁXIMO, JIVALDO DO ROSÁRIO MATOS. Study of thermal behavior of phytic acid. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 49, n. 2, p. 275-283, 2013.

DE ROSSI, T., M. A. B. LOZOVVOY, R. V. DA SILVA, E. V. FERNANDES, T. H. GERALDINO, I. C. COSTA, H. O. SARIDAKIS, M. A. E. WATANABE, I. FELIPE. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde** v. 32, n. 1 p. 15-28, 2011.

DEL ROSSO, JAMES Q. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. **Journal of Clinical & Aesthetic Dermatology** v. 7, p. 7, 2014.

DERBY, R., ROHAL, P., JACKSON, C., BEUTLER, A., OLSEN, C.. Novel treatment of onychomycosis using over-the-counter mentholated ointment: a clinical case series. **The Journal of the American Board of Family Medicine** v. 24, n. 1, p. 69-74, 2011.

DINIZ, M.F.F.M. **Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich.** 147p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

DOURADO. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas – Tese (Doutorado).** Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, p. 121, 2012.

ELAISSI, A., ROUIS, Z., SALEM, N. A. B., MABROUK, S., BEN SALEM, Y., SALAH, K. B. H., KHOUJA, M. L Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

EL-HAWARY, S. S., R. H. EL-SOFANY, A. R. ABDEL-MONEM, R. S. ASHOUR, A. A. SLEEM. Seasonal variation in the composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil and its biological activities. **American Journal of Essential Oils and Natural Products** v. 1, n. 2, p. 11-18, 2013.

EL-HAWARY, S. S., R. H. EL-SOFANY, A. R. ABDEL-MONEM, R. S. ASHOUR, A. A. SLEEM. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae). **Pharmacognosy Journal** v. 4, n 32, p. 45-54, 2012.

ELLABIB, M., M. AGAJ, Z. KHALIFA, K. KAVANAGH. Yeasts of the genus *Candida* are the dominant cause of onychomycosis in Libyan women but not men: results of a 2-year surveillance study. **British Journal of Dermatology** v. 146, n. 6 p. 1038-1041, 2002.

ENDO, E. H., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., & DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from

pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology** v. 161, n. 7, p. 534-540, 2010.

FAZOLIN, M., J. L. V. ESTRELA, V. CATANI, M. R. ALÉCIO AND M. S. D. LIMA. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia** v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FEITOSA, R. M., DANTAS, R. D. L., GOMES, W. C., MARTINS, A. N. A., ROCHA, A. P. T. Influência do método de extração no teor de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** v. 9, n. 4, p. 238-241, 2015.

FERNANDES, C. P., M. P. MASCARENHAS, F. M. ZIBETTI, B. G. LIMA, R. P. OLIVEIRA, L. ROCHA, D. Q. FALCÃO. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 23, n. 1, p. 108-114, 2013.

FERNANDES, X. PASSOS, C. COSTA, J. LEMOS, M. SILVA. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. **Mycoses** v. 53, n. 1 p. 68-71, 2010.

FERNÁNDEZ DE SIMON, B. G. MUINO, E. CADAHÍA. Characterization of volatile constituents in commercial oak wood chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 58, n 17, p. 9587-9596, 2010.

FERREIRA, M. A., R. SANTIAGO, T. DE SOUZA, E. T. EGITO, E. OLIVEIRA, L. L. SOARES. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **AAPS PharmSciTech** v. 11, n. 3, p. 1383-1390, 2010.

FERREIRA, S. D., M. DE MORAIS ECHER, L. G. BULEGON, M. A. PASTÓRIO, V. A. EGEWARTH, R. YASSUE, D. ACHRE. Influência da adubação nitrogenada na produção do manjerição Toscano folha de alface (*Ocimum basilicum* L.) em duas épocas, para fins medicinais. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** v. 20, n 4, p. 1-6, 2015.

FIGUEREDO, CLIMÉRIO AVELINO DE, IDÊ GOMES DANTAS GURGEL, GARIBALDI DANTAS GURGEL JUNIOR. The National Policy on Medicinal Plants and Phytotherapy: building, perspectives and challenges. *Physis: Revista de Saúde Coletiva* v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FIRMO, W. D. C. A., DE MENEZES, V. D. J. M., DE CASTRO PASSOS, C. E. DIAS, C. N., ALVES, L. P. L., DIAS, I. C. L., OLEA, R. S. G.. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 1-6, 2012.

FLORES, F. C., R. F. RIBEIRO, A. F. OURIQUE, C. M. B. ROLIM, C. D. B. D. SILVA, A. R. POHLMANN, R. C. R. BECK, S. S. GUTERRES. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova** v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FONSECA, M., M. LEHNER, M. GONÇALVES, T. PAULA JÚNIOR, A. SILVA, F. BONFIM A. PRADO. Potential of essential oils from medicinal plants to control plant pathogens. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

FRANGE, R. e M. GARCIA. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 30, n. 3, p. 263-271, 2010.

FREIRES, I. D. A., L. A. ALVES, V. D. C. JOVITO, L. D. F. D. D. ALMEIDA, R. D. D. CASTRO, W. W. N. PADILHA. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontologia Clínico-Científica** v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010.

GALVÃO RODRIGUES, F. F., J. G. M. COSTA, F. F. G. RODRIGUES, A. R. CAMPOS. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2013.

GARCIA, LORENA COSTA, RENATA VALERIANO TONON, AND MIRIAM DUPAS HUBINGER. Effect of homogenization pressure and oil load on the emulsion properties and the oil retention of microencapsulated basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). **Drying Technology** v. 30, n.13, p. 1413-1421, 2012.

GASPAR-MARQUES, C., P. RIJO, M. F. SIMÕES, M. A. DUARTE, B. RODRIGUEZ. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin-and vancomycin-resistant bacteria. **Phytomedicine** v. 13, n. 4, p. 267-271, 2006.

GHARIBZAHEDI, S. M. T., S. M. MOUSAVI, F. KHODAIYAN AND M. HAMED. Optimization and characterization of walnut beverage emulsions in relation to their composition and structure. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 50, n. 2, p. 376-384, 2012.

GHOSH, S., PRADHAN, M., PATEL, T., HAJ-SHAFIEL, S., ROUSSEAU, D. "Long-term stability of crystal-stabilized water-in-oil emulsions." **Journal of Colloid and Interface Science** v. 460, p. 247-257, 2015.

GIKNIS, M. AND C. CLIFFORD. Clinical laboratory parameters for Crl: CD (SD) rats. **Charles River Laboratories**, p. 1-14, 2006.

GILLES, M., ZHAO, J., AN, M., & AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry** v. 119, n. 2, p. 731-737, 2010.

GIRALDI, MARIANA, NATALIA HANAZAKI. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GIRON, D.. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of thermal analysis and Calorimetry** v. 68, n 2, p. 335-357, 2002.

GOLDBECK, J. C., J. E. DO NASCIMENTO, R. G. JACOB, Â. M. FIORENTINI, W. P. DA SILVA. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Industrial Crops and Products** v. 60, p. 304-309, 2014.

GOLDMAN, L. E D. AUSIELLO. **Cecil-Tratado de Medicina Interna**, 2v, Elsevier Brasil, 3000p., 2005.

GONZALEZ, J. J. CRUZ, H. DOMINGUEZ, J. PARAJO. Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. **Food Chemistry** v. 84, n. 2, p. 243-251, 2004.

GRAYER, R. J., M. R. ECKERT, A. LEVER, N. C. VEITCH, G. C. KITE, A. J. PATON. Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 38, n. 3, p. 335-341, 2010.

GRIFFIN. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal Sociedad Cosmetics Chemits**. 1949; v. 1, p. 311-26, 1949.

GROVER, C. E A. KHURANA. Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology** v. 78 n. 3, p. 263, 2012.

GUERRA-ROSAS, M. I., MORALES-CASTRO, J., OCHOA-MARTÍNEZ, L. A., SALVIA-TRUJILLO, L., MARTÍN-BELLOSO, O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids** v. 52, p. 438-446, 2016.

GUINDANI, C., N. MEZZOMO, e SRS FERREIRA. EXTRATO DE TORTA DE CHIA (Salvia hispanica) OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings** v. 1, n. 2, p. 4870-4877, 2015.

GUNDIDZA, M., GWERU, N., MAGWA, M. L., MMBENGWA, V., SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology** v. 8, p. 24, 2009.

GUPTA, ADITYA K., MARYSE PAQUET, FIONA C. SIMPSON. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in dermatology** v. 31, n. 5, p. 544-554, 2013.

GURGEL, A. P. A. D., J. G. DA SILVA, A. R. S. GRANGEIRO, D. C. OLIVEIRA, C. M. LIMA, A. C. DA SILVA, R. A. OLIVEIRA, I. A. SOUZA. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (*Lamiaceae*). **Journal of Ethnopharmacology** v. 125, n. 2, p. 361-363, 2009.

HADACEK, FRANZ, AND HARALD GREGER. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis** v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HADDOUCHI, F., T. M. CHAOUICHE, Y. ZAOUALI, R. KSOURI, A. ATTOU AND A. BENMANSOUR. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. **Food Chemistry** v. 141, n. 1, p. 253-258, 2013.

HAINES, PETER J.. **Thermal methods of analysis: principles, applications and problems**, Springer Science & Business Media, 2012.

HALBAUT, L.; BARBÉ, C.; DEL POZO, A. An investigation into physical and chemical properties of semi-solid self-emulsifying systems for hard gelatin capsules. **International Journal of Pharmaceutics** v. 130, n. 2, p. 203-212, 1996.

HARLEY, R. M.. Checklist and key of genera and species of the *Lamiaceae* of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia** v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HAZRA, A., ALEXANDER, K., DOLLIMORE, D., RIGA, A. Characterization of some essential oils and their key components: thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** v. 75, n.1, p. 317-330, 2004.

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais, **Manole**, 2008.

HERZI, S., W. ESSAFI, S. BELLAGHA, F. LEAL-CALDERON. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 441, p. 489-495, 2014.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLENBACH, E.. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. **Mycoses** v. 51, n. 2, p. 25-45, 2008.

HOSSAIN, H., ANSARI, N. SCHULZ-WEIDNER, W. E. WETZEL, T. CHAKRABORTY, E. DOMANN. "Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral microbiology and immunology** 18(5): 302-308, 2003.

HOSSEINI, A., JAFARI, S. M., MIRZAEI, H., ASGHARI, A., AKHAVAN, S. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. **Carbohydrate Polymers** v. 126, p. 1-8, 2015.

HOUGHTON, P. J., HOWES, M. J., LEE, C. C., STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology** v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HUCK-IRIART, C., M. S. ÁLVAREZ-CERIMEDO, R. J. CANDAL, M. L. HERRERA. "Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** 16(5): 412-420, 2011.

HUNTER, T. N., R. J. PUGH, G. V. FRANKS, G. J. JAMESON. The role of particles in stabilising foams and emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** 137(2): 57-81, 2008.

IGANCI, J., V. BOBROWSKI, G. HEIDEN, V. STEIN, B. ROCHA. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivo Instituto Biologia** v. 73, p. 79-82, 2006.

ISHNAVA, K. B., J. B. CHAUHAN, M. B. BARAD. Anticariogenic and phytochemical evaluation of *Eucalyptus globules* Labill. **Saudi journal of biological sciences** v. 20, n. 1, p. 69-74, 2013.

JAIJOY, K., SOONTHORNCHAREONNON, N., PANTHONG, A., SIREERATAWONG, S. Anti-ulcerogenic Activity of the Standardized Water Extract of *Phyllanthus emblica* Linn. **Planta Medica** v. 77, n.12, p. 22, 2011.

JANSSENS, SANDRIEN, E GUY VAN DEN MOOTER. Review: physical chemistry of solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 61, n.12, p. 1571-1586, 2009.

JHA, B., S. MAHADEVAMURTHY, J. SUDISHA, A. BORA. Isolation, Identification and Antifungal Susceptibility Test of Dermatophytes from the Patients with Onychomycosis in Central Nepal. **American Journal of Dermatology and Venereology** v. 4n. 3, p. 30-36, 2015.

JOSHI, R., V. BADA KAR, S. KHOLKUTE. Carvacrol rich essential oils of *coleus aromaticus* (Benth.) from Western Ghats region of North West Karnataka, India. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, p. 1307-1310, 2011.

KANEKO, J. J., J. W. HARVEY AND M. L. BRUSS. **Clinical biochemistry of domestic animals**, Academic press, 2008.

KANTARCI, G., ÖZGÜNEY, I., KARASULU, H. Y., ARZIK, S., GÜNERI, T. Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium:

preparation, characterization, release rate, and skin irritation studies. **AAPS PharmSciTech** v. 8, n. 4, p. 75-81, 2007.

KARKOWSKA-KULETA, J., M. RAPALA-KOZIK, A. KOZIK. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica** v. 56, n. 2, p. 211, 2009.

KHALID, A. AND A. EL-GOHARY. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grow in Egypt. **International Food Research Journal** v. 21, p.1859-1862, 2014.

KHAN, B. A., AKHTAR, N., KHAN, H. M. S., WASEEM, K., MAHMOOD, T., RASUL, A., KHAN, H. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 5, n. 25, p. 2715-2725, 2011.

KHANI, A. E J. ASGHARI. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Science** v. 12, n. 1, p. 73, 2012.

KLEIN, T., R. LONGHINI, M. L. BRUCHI, J. C. P. D. MELLO. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 30, n.3, p. 241-248, 2010.

KOGA, NOBUYOSHI. Ozawa's kinetic method for analyzing thermoanalytical curves. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** v. 113, n. 3, p. 1527-1541, 2013.

KOMAIKO, JENNIFER, ASHTRI SASTROSUBROTO, DAVID JULIAN MCCLEMENTS. Formation of oil-in-water emulsions from natural emulsifiers using spontaneous emulsification: Sunflower phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 63, n. 45, p. 10078-10088, 2015.

KUO, Y.-S., H.-F. CHIEN, W. LU. *Plectranthus amboinicus* and *Centella asiatica* cream for the treatment of diabetic foot ulcers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 1-9, 2012.

KWEKA, E. J., M. NYINDO, F. MOSHA, A. G. SILVA. Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. **Parasites and Vectors** v. 4, p. 129, 2011.

LAFHAL, S., P. VANLOOT, I. BOMBARDA, R. VALLS, J. KISTER, N. DUPUY. Raman spectroscopy for identification and quantification analysis of essential oil varieties: a multivariate approach applied to lavender and lavandin essential oils. **Journal of Raman Spectroscopy** v. 46, n. 6, p. 577-585, 2015.

LAM, R. S. AND M. T. NICKERSON. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry** v. 141, n. 2, p. 975-984, 2013.

LANÇAS, F. M., H. S. DÓREA, R. A. MULLER, C. B. FAGUNDES. NOVAS APLICAÇÕES DE SISTEMAS SFE" HOME-MADE.: IV. QUALIDADE DOS ALIMENTOS." **Food Science and Technology** (Campinas) v. 17, n. 4, p. 432-436, 1997.

LEAL, L. B., SOUSA, G. D., SEIXAS, K. B., SOUZA, P. H. N. D., SANTANA, D. P. D. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 49, n. 1, p. 167-173, 2013.

LEITE JÚNIOR, D. P., A. C. A. YAMAMOTO, E. R. MARTINS, A. F. R. TEIXEIRA, R. C. HAHN. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 86, p. 675-680, 2011.

LEITE, A. S. S.. Avaliação micológica das amostras ungueais de pacientes com diagnóstico clínico de onicomicose atendidos no hospital universitário de Brasília. **Brasília Medica** v. 47, n. 3, p. 320-325, 2010.

LEMAIRE, C., GODEFROY, N., COSTINA-PARVU, I., RINCHEVAL, V., RENAUD, F., TROTOT, P., VAYSSIERE, J. L. Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76Rb truncated form of Rb. **Oncogene** v. 24, n.20, p. 3297-3308, 2005.

LEROY, O., J.-P. MIRA, P. MONTRAVERS, J.-P. GANGNEUX, O. LORTHOLARY, A. S. GROUP. Comparison of *albicans* vs. *non-albicans* candidemia in French intensive care units. **Critical Care** v. 14, n. 3, p. 1-6, 2010.

LI, X., LUO, Y., WANG, L., LI, Y., SHI, Y., CUI, Y., XUE, M. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of ethnopharmacology** 131.1: 110-115, 2010.

LI, Y., J. ZHENG, H. XIAO, D. J. MCCLEMENTS. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids** v. 27, n. 2, p. 517-528, 2012.

LIANG, Y., G. GILLIES, H. PATEL, L. MATIA-MERINO, A. YE, M. GOLDING. Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. **Food Hydrocolloids** v. 36, p. 245-255, 2014.

LIMA, C. G., VILELA, A. F. G., SILVA, A. D., PIANNOVSKI, A. R., SILVA, K. K., CARVALHO, V. F., FERRARI, M.). Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

LIMA, José Renato de Oliveira. Desenvolvimento de materiais catalisadores heterogêneos a base de estrôncio (Sr) e zircônio (Zr) para transesterificação de óleos e gorduras-síntese, caracterização e performance reacional, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de São Paulo, 179 p., 2012.

LIMA, R. K.. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)**- Universidade Federal de Lavras, p. 57, 2006.

LIZARRAGA, M. S., PAN, L. G., ANON, M. C., SANTIAGO, L. G Stability of concentrated emulsions measured by optical and rheological methods. Effect of processing conditions-I. Whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids** v. 22, n .5, p. 868-878, 2008.

LORENZI, H., F. J. MATOS AND J. M. FRANCISCO. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. P.imprenta: Nova Odessa: Instituto *Plantarum* de Estudos da Flora, 512 p., 2002.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 711p, 2006.

LOSADA-BARREIRO, S., V. SÁNCHEZ-PAZ, C. BRAVO-DÍAZ. Effects of emulsifier hydrophile-lipophile balance and emulsifier concentration on the distributions of gallic acid, propyl gallate, and α -tocopherol in corn oil emulsions. **Journal of colloid and interface science** v. 389, n. 1, p. 1-9, 2013.

LUKHOB, C. W., M. S. SIMMONDS, A. J. PATON. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology** v. 103, n. 1, p. 1-24, 2006.

MACEDO, J. P., FERNANDES, L. L., FORMIGA, F. R., REIS, M. F., JÚNIOR, T. N., SOARES, L. A., EGITO, E. S. T. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. **AAPS Pharmscitech** v. 7, n. 1, p.146-152, 2006.

MAHMOOD, TARIQ, AND NAVEED AKHTAR. Stability of a cosmetic multiple emulsions loaded with green tea extract. **The Scientific World Journal** v. 13, p. 1-9, 2013.

MAINDARKAR, S. N., P. BONGERS, M. A. HENSON. Predicting the effects of surfactant coverage on drop size distributions of homogenized emulsions. **Chemical Engineering Science** v. 89, p. 102-114, 2013.

MANJAMALAI, A., T. ALEXANDER, V. GRACE. Bioactive evaluation of the essential oil of *plectranthus amboinicus* by gc-ms analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**v. 4, n. 3, p. 205-211, 2012.

MANN, C. M., AND J. L. MARKHAM. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology** v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

MARIZ, S. R., CERQUEIRA, G. S., ARAÚJO, W. C., DUARTE, J. C., MELO, A. F., SANTOS, H. B., MEDEIROS, I. A. Acute toxicological studies of the ethanol extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 16, n.3, p. 372-378, 2006.

MARTI-MESTRES, GILBERTE, AND FRANÇOISE NIELLOUD. Emulsions in health care applications-an overview. **Journal of Dispersion Science and Technology** v. 23, n. 1, p. 419-439, 2002.

MARTINS, N., I. C. FERREIRA, L. BARROS, S. SILVA, M. HENRIQUES. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia** v. 177, n. 5-6, p. 223-240, 2014.

MARTINS, P., P. SBAITE, C. BENITES, M. MACIEL. Thermal Characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils. Chemical Engineering Transactions: **10th International Conference on Chemical and Process Engineering, Italian Association for Chemical Engineering: Florence, Italy**, 2011.

MASMOUDI, H., LE DRÉAU, Y., PICCERELLE, P., KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics** v. 289, n.1, p. 117-131, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 235–245, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. AND J. RAO. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MÉAN, M., O. MARCHETTI AND T. CALANDRA. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care** v. 12, n. 1, p. 204, 2008.

MELO, S. K. M., LIRA, L. B. D., ALMEIDA, T. L. A. C. D., REGO, E. W., MANSO, H. E. C. D. C., MANSO FILHO, H. C. Hematological parameters and blood biochemistry in pleasure horses in tropical region. **Ciência Animal Brasileira** v.14, n. 2, p. 208-215, 2013.

MORAES, L. G. D., A. M. ALONSO, E. C. OLIVEIRA-FILHO. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde** v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MORAIS, GILSANE GARCIA. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia*

ginóide (celulite). Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p.10-121, 2006.

MOREIRA, M. R., PONCE, A. G., DEL VALLE, C. E., ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology** v. 38, n.5, p. 565-570, 2005.

MOTTA, V. **Bioquímica clínica para o laboratório.** 5ª edição." Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MUKINDA, JAMES T., AND PETER FK EAGLES. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 128, n. 1, p. 236-240, 2010.

MURTHY, P. S., K. RAMALAKSHMI, P. SRINIVAS. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chemistry** v. 114, n. 3, p. 1014-1018, 2009.

MYBURG, A. A., D. GRATTAPAGLIA, G. A. TUSKAN, U. HELLSTEN, R. D. HAYES, J. GRIMWOOD, J. JENKINS, E. LINDQUIST, H. TICE, D. BAUER. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature** v. 510, p. 356-362, 2014.

NAZAR, J. R., P. E. GEROSA, O. A. DÍAZ. Onicomycosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. **Revista Argentina de Microbiología** v. 44, n. 1, p. 12-19, 2012.

NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa, 2003.

NEGRI, M., C. BOTELHO, S. SILVA, L. M. R. H. LOPES, M. HENRIQUES, J. AZEREDO, R. OLIVEIRA. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology** v. 60, n. 9, p. 1270-1275, 2011.

NETO, HÉLIO SALVIO. **Estudo de compatibilidade fármaco/excipientes e de estabilidade do prednicarbato por meio de técnicas termoanalíticas, e encapsulação do fármaco em sílica mesoporosa do tipo SBA-15.** Diss. Universidade de São Paulo, p. 260, 2010.

NETO, M. M., C. C. DANESI AND D. T. UNFER. Candidíase bucal revisão da literatura. **Saúde (Santa Maria)** v. 31, n. 1 e 2, p. 16-26, 2005.

NOGUEIRA, J. C. R., M. D. F. M. DINIZ AND E. O. LIMA. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** v. 74, n. 1, p. 118-124, 2008.

O'DWYER, S. P., D. O'BEIRNE, D. N. EIDHIN, A. A. HENNESSY, B. T. O'KENNEDY. Formation, rheology and susceptibility to lipid oxidation of multiple emulsions (O/W/O) in table spreads containing omega-3 rich oils. **LWT-Food Science and Technology** 51(2): 484-491.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G., SANTOS, R. B., REIS, F. O., MATSUMOTO, S. T., BISPO, W. M. S., MACHADO, L. P., & OLIVEIRA, L. F. M. Fungitoxic effect of essential oil from aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI) on *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.

OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., CORREA, M. A., CERA, L. F. R., FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova** v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M., OLIVEIRA, N. A., RESENDE, U. M., MARTINS, P. F. R. B.. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** v. 71, n. 1, p. 283-289, 2011.

OLIVEIRA, C. E. L. AND M. A. CREMASCO. Determination of the vapor pressure of *Lippia gracilis* Schum essential oil by thermogravimetric analysis. **Thermochimica Acta** v. 577, p. 1-4, 2014.

OLIVEIRA, M. A., M. I. YOSHIDA, E. C. D. L. GOMES, W. MUSSEL, C. SOARES, G. PIANETTI. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova** v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, R. D. A. G. D., E. D. O. LIMA, E. L. D. SOUZA, W. L. VIEIRA, K. R. FREIRE, V. N. TRAJANO, I. O. LIMA, R. N. SILVA-FILHO. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17, n. 2, p. 186-190, 2007.

ONISZCZUK, A. AND R. PODGÓRSKI. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. **Industrial Crops and Products** v. 76, p. 509-514, 2015.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan** v. 38, n. 11, p. 1881-1886, 1965.

PATEL, P. N.; PATEL, K. M.; CHAUDHARY, D. S.; PARMA R, K. G.; PATEL, H. A.; KANSAGRA, C. D.; SEN, D. J. Extraction of herbal aroma oils from solid surface. **Pharmacie Globale**, v. 2, n. 9, p. 300-312, 2011.

PATEL, R., N. K. MAHOBIA, R. GENDLE, B. KAUSHIK, S. K. SINGH. Diuretic activity of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng in male albino rats. **Pharmacognosy Research** v. 2, n. 2, p. 86, 2010.

PAVELA, R.. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops and Products** v. 76, p. 174-187, 2015.

PAVLIC D, B., S. VIDOVID, J. VLADID, R. RADOSAVLJEVID, Z. ZEKOVID. solation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids** v. 99, p. 23-28, 2015.

PAWLOWSKI, Â., E. KALTCHUK-SANTOS, C. ZINI, E. CARAMÃO, G. SOARES. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany** v. 80, p. 96-103, 2012.

PELISSARI, G. P., R. C. L. R. PIETRO, R. R. D. MOREIRA. Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 20, n. 1, p. 70-74, 2010.

PEREIRA, FILLIPE DE OLIVEIRA. **Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum***. Tese de Doutorado-Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. 181 p.2012.

PEREIRA, J. V. **Bioquímica Clínica. 2. ed. João Pessoa**: Editora Universitária/ UFPB, 2008.

PEREIRA, L. J. B. AND E. E. GARCIA-ROJAS. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural** v. 45, n. 1, p. 155-162, 2015.

PEREIRA, V., C. DIAS, M. VASCONCELOS, E. ROSA, M. SAAVEDRA. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products** v. 52, p. 1-7, 2014.

PERFEITO, J. P. S.. O registro Sanitário de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento, p. 29-40, 2012.

PFALLER, M. AND D. DIEKEMA. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews** v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BAUER, R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, p. 344-362, 2015.

PIATI, A., M. DE HOLANDA NOZAKI, C. F. SCHNEIDER. Efeito do óleo essencial de eucalipto sobre *Penicillium digitatum*. **Revista Acadêmica, Ciências Agrária Ambiental** v. 11, n. 2, p. 19-26, 2013.

PICHOT, R., F. SPYROPOULOS, I. NORTON. O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 352, n. 1, p. 128-135, 2010.

PIRACCINI, B. M. AND A. ALESSANDRINI. Onychomycosis: A Review. **Journal of Fungi** v. 1, n. 1, p. 30-43, 2015.

PIRRALHO, M., D. FLORES, V. B. SOUSA, T. QUILHÓ, S. KNAPIC, H. PEREIRA. Evaluation on paper making potential of nine *Eucalyptus* species based on wood anatomical features. **Industrial Crops and Products** v. 54, p. 327-334, 2014.

POITOUT, F. M.; MCCARTNEY, J. E. Interpretation of hematology data in preclinical toxicological studies. In: WEISS, D. J., WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**, ed. 5. Blackwell Publishing: p. 78-84, 2010.

RAJA, R. R.. Medicinally potential plants of Labiatae (*Lamiaceae*) family: an overview. **Research Journal of Medicinal Plant** v. 6, n. 3, p. 203-213, 2012.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**, Guanabara Koogan, p. 121-128, 1995.

RAVIKUMAR, V., M. DHANAMANI, T. SUDHAMANI. In-vitro anti-inflammatory activity of aqueous extract of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Ancient Science of Life** v. 28, n. 4, p. 7, 2009.

RIBEIRO, SILVANA ELLEN, AND RODRIGO IPPOLITO BOUÇAS. Biochemical evaluation of rats treated with dry extract of eggplant (*Solanum melongena* L.) and artichoke (*Cynara Scolymus*) submitted or not to physical exercise. **Science** v. 6, n. 2, p. 89-99, 2015.

RICE, L., G. BRITS, C. POTGIETER AND J. VAN STADEN. *Plectranthus*: A plant for the future? **South African Journal of Botany** v. 77, n. 4, p. 947-959, 2011.

RICHARDSON, D. M. AND M. REJMÁNEK. Trees and shrubs as invasive alien species—a global review. **Diversity and Distributions** v. 17, n. 5, p. 788-809, 2011.

ROCHA, ALDEÍDE DE OLIVEIRA BATISTA, JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA, AND KARDILANDIA MENDES DE OLIVEIRA. Efeito toxicológico do extrato

hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar. **Revista Brasileira Farmacognosia** v. 93, n. 3, p. 371-378, 2012.

ROQUE, ALAN DE ARAÚJO, RENATO DE MEDEIROS ROCHA, MARIA IRACEMA BEZERRA LOIOLA. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** v. 12, n.1, p. 31-42, 2010.

ROSARIO, ALESSANDRO SILVA, JOSÉ FERNANDO ANDRADE BAUMGRATZ, RICARDO DE S. SECCO. Taxonomic notes in *Calyptanthus* (Myrciinae; Myrtaceae) in the Brazilian Amazon. **Phytotaxa** v. 186, n. 3, p. 158-165, 2014.

ROUTT, E. T., JIM, S. C., ZEICHNER, J. A., & KIRCIK, L. H. What is new in fungal pharmacotherapeutics? **Journal of drugs in dermatology** v. 13, n.4, p. 391-5, 2014.

RUKAYADI, Y., LAU, K. Y., ZAININ, N. S., AKARIA, M. Screening antimicrobial activity of tropical edible medicinal plant extracts against five standard microorganisms for natural food preservative. **International Food Research Journal** v. 20, n. 5, p. 2905-2910, 2013.

RUZSÍKOVÁ, A., SOUČKOVÁ, L., SUK, P., OPATŘILOVÁ, R., KEJDUŠOVÁ, M., ŠRÁMEK, V. Quantitative analysis of drug losses administered via nasogastric tube-In vitro study. **International Journal of Pharmaceutics** v. 478, n. 1, p. 368-371, 2015.

SÁ, E. R. N., MEDEIROS, C. I. S., OLIVEIRA, J. R. D. M. S., DE JESUS EVANGELISTA, A. J., MAGALHÃES, M. I. S., DE ALMEIDA FILHO, G. G. PESSÔA, H. D. L. F.. “In Vitro” Antibacterial Activity of the Hidroalcoholic Extract of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Barks. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 1-5, 2014.

SAITO, M. L.. Plantas aromáticas e seu uso na agricultura, Embrapa Meio Ambiente, p 26-27, 2000.

SALASANTI, C. D., E. Y. SUKANDAR, AND I. FIDRIANNY. Acute and sub chronic toxicity study of ethanol extract of *Anredera cordifolia* (ten.) V. *Steenis* leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 6.5: 348-52, 2014.

SALASANTI, C., E. SUKANDAR AND I. FIDRIANNY. Acute and sub chronic toxicity study of ethanol extract of *Anredera cordifolia* (ten.) V. *Steenis* leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 6, n. 5, p. 348-352, 2014.

SAMAVATI, V., Z. EMAM-DJOMEH, M. A. MOHAMMADIFAR, M. OMID, A. MEHDINIA. Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. **Journal of Texture Studies** v. 43, n. 1, p. 63-76, 2012.

SANTANA, J. S., P. SARTORELLI, J. H. G. LAGO, A. L. MATSUO. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*). **Química Nova** v. 35, n. 11, p. 2245-2248, 2012.

SANTANA, L. C. L. R., BRITO, M. R. M., SOUSA, G. F., FREITAS, R. M. Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais** v. 16, n.3, p. 670-678, 2014.

SANTOS, A. C. A., M. ROSSATO, L. A. SERAFINI, M. BUENO, L. B. CRIPPA, V. C. SARTORI, E. DELLACASSA, P. MOYNA. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 20, p. 154-159, 2010.

SANTOS, E. B., G. S. DANTAS, H. B. SANTOS, M. DINIZ, F. C. SAMPAIO. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 19, p. 321-324, 2009.

SANTOS, Í., T. SANTOS, F. DA SILVA, P. GAGLIARDI, L. DE OLIVEIRA JUNIOR, A. BLANK. ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi COMO CONTROLE ALTERNATIVO DE *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*, FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE PÓS-COLHEITA. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias** v. 4, n. 4, p. 1409-1417, 2014.

SANTOS, M. D., R. LIMA, C. FERNANDES, A. SILVA, D. LIMA, C. TEIXEIRA AND V. FACUNDO. Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman. **Revista Fitos Eletrônica** v. 3, p. 1-10, 2013.

SANTOS, T. G., REBELO, R. A., DALMARCO, E. M., GUEDES, A., GASPER, A. L. D., CRUZ, A. B., NUNES, R. K. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf essential oil from *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova** v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SANTOSA, F. R., R. BRAZ-FILHO AND R. N. Castro. INFLUÊNCIA DA IDADE DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p S1-S10, 2015.

SCHÖNE, F., A. VETTER, H. HARTUNG, H. BERGMANN, A. BIERTÜMPFEL, G. RICHTER, S. MÜLLER, G. BREITSCHUH. Effects of essential oils from fennel (*Foeniculi aetheroleum*) and caraway (*Carvi aetheroleum*) in pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** v. 90, p. 500-510, 2006.

SENTHILKUMAR, ANNADURAI, AND VENUGOPALAN VENKATESALU. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. **Parasitology Research** 107.5: 1275-1278, 2010.

SHEMER, A., N. NATHANSOHN, H. TRAU, B. AMICHAÏ, M. H. GRUNWALD. Ciclopirox nail lacquer for the treatment of onychomycosis: An open non-comparative study. **The Journal of Dermatology** v. 37, n. 2, p. 137-139, 2010.

SHERRY, E. AND P. WARNKE. Successful use of an inhalational phytochemical to treat pulmonary tuberculosis: A case report." **Phytomedicine** v. 11, n. 2, p. 95-97, 2004.

SIANI, A. C., M. C. SOUZA, M. G. HENRIQUES, M. F. RAMOS. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. **Pharmaceutical Biology** v. 51, n. 7, p. 881-887, 2013.

SILVA CARVALHO, K., DA CUNHA, S. L., DE SOUZA, I. A., GUALBERTO, S. A., DA CRUZ, R. C. D., DOS SANTOS, F. R., DE CARVALHO, M. G. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology Research**, p. 1-8, 2016.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; BORBA, V. F. C.; EGITO, E. S. T.; DE SANTANA, D. P. Use of pseudo-ternary phase diagrams as a tool to produce transdermal nanoemulsion. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 245-249, 2009.

SILVA, J., W. ABEBE, S. SOUSA, V. DUARTE, M. MACHADO, F. MATOS. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 89, n. 2, p. 277-283, 2003.

SILVA, M. I. G., A. P. S. GONDIM, I. F. S. NUNES, F. C. F. SOUSA. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SILVA, S. L. D., NASCIMENTO, A. A. D., RIBEIRO, E. F. B., RIBEIRO, R. B., ALVES, C. M., SANTOS, A. M. D., MIRA NETO, R. D. A. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica** v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SILVA, V. A. D., A. F. R. D. FREITAS, M. D. S. V. PEREIRA, A. V. PEREIRA. Avaliação da atividade antimicrobiana. "in vitro" da *Lippia sidoides* CHAM SOBRE *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Científica no Semiárido** v. 5, n.1, p. 52-56, 2010.

SIMÕES, M. F., P. RIJO, A. DUARTE, D. BARBOSA, D. MATIAS, J. DELGADO, N. CIRILO, B. RODRÍGUEZ. Two new diterpenoids from *Plectranthus* species. **Phytochemistry Letters** v. 3, n. 4, p. 221-225, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136- 141, 2012

SONG, X.; PEI, Y.; QIAO, M.; MA, F.; REN, H.; ZHAO, Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256-263, 2015.

SOOTTITANTAWAT, A., H. YOSHII, T. FURUTA, M. OHKAWARA, P. LINKO. Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. **Journal of Food Science** v. 68, n. 7, p. 2256-2262, 2003.

SOTIROUDIS, T. G., SOTIROUDIS, G. T., VARKAS, N., XENAKIS, A. The role of endogenous amphiphiles on the stability of virgin olive oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society** v. 82, n. 6, p. 415-420, 2005.

SOUSA, F. C. F., C. T. V. MELO, M. C. O. CITÓ, F. H. C. FÉLIX, S. M. M. VASCONCELOS, M. M. F. FONTELES, J. M. BARBOSA FILHO, G. S. B. VIANA. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, E. L. et al. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 549-558, 2005.

SOUZA, LUCIANA FERREIRA LOBO. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária)-Universidade de Brasília, Brasília, **Atividade antimicrobiana de extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a bactérias relacionadas à mastite bovina**, p. 123-132, 2011.

SOUZA, P. B. D., S. V. MARTINS, S. R. COSTALONGA, G. D. O. COSTA. Florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea do sub-bosque de um povoamento de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em Viçosa, MG, Brasil. **Revista Árvore** v. 31, n. 3, p. 533-543, 2007.

STAVRI, M., A. PATON, B. W. SKELTON AND S. GIBBONS. Antibacterial diterpenes from *Plectranthus ernstii*. **Journal of Natural Products** v. 72, n. 6, p. 1191-1194, 2009.

STEVENS, K.R; MYLECRAINEL, L. Issues in chronic toxicology. In: Haves, A.W. (Ed), **Principles and methods of toxicology**, 3 ed. New York: Raven Press, 673p, 1994.

SURaweera, R. K., PASANSI, H., HERATH, H., WICKRAMARATNE, D., SUDESHIKA, S., NIYANGODA, D., SAKKEENA, M. Formulation and stability evaluation of ketoprofen loaded virgin coconut oil based creamy emulsion. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 6, n. 8, p. 249-254, 2014.

SURJUSHE, A., R. KAMATH, C. OBERAI, D. SAPLE, M. THAKRE, S. DHARMSHALE, A. GOHIL. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology** v. 73, n. 6, p. 397, 2007.

TADROS, T. F.. **Formulation of Disperse Systems: Science and Technology**. John Wiley & Sons, p. 212-227, 2014.

TAUBER, A. C. C. MÜLLER-GOYMANN. Comparison of the antifungal efficacy of terbinafine hydrochloride and ciclopirox olamine containing formulations against the dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an infected nail plate model. **Molecular pharmaceutics** v. 11, n. 7, p. 1991-1996, 2014.

TENNANT, B. C. AND S. CENTER. **Hepatic function**. Clinical biochemistry of domestic animals, v. 5, p. 327-352, 2008.

TONIAL, F.. "Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius raddi* (Aroeira), [Mestrado em Microbiologia]. *Paraná: Universidade Federal do Paraná*, p. 160-174, 2010.

TRABELSI, K., EL ABED, K., TREPANOWSKI, J. F., STANNARD, S. R., GHLISSI, Z., GHOSZI, H., JAMMOUSSI, K. Effects of Ramadan fasting on biochemical and anthropometric parameters in physically active men. **Asian Journal Of Sports Medicine** v. 2, n. 3, p. 134, 2011.

TYAGI, A. K. A. MALIK. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

TYAGI, AMIT KUMAR, AND ANUSHREE MALIK. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry** v. 126, n. 1, p. 228-235, 2011.

UKWUANI, A. N., ABUBAKAR, M. G., HASSAN, S. W., & AGAIE, B. M. Toxicological studies of hydromethanolic leaves extract of *Grewia crenata*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research** 4.4: 245-249, 2012.

ULTEE, A., M. H. J. BENNIK, AND R. MOEZELAAR. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology** v.68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

USHIKUBO, F. D R. CUNHA. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids** v. 34, p. 145-153, 2014.

VAN DEN DOOL, H. AND P. D. KRATZ. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A** v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN ZYL, R., F. KHAN, T. EDWARDS, S. DREWES. Antiplasmodial activities of some abietane diterpenes from the leaves of five *Plectranthus* species. **South African Journal of Science** v. 104, p. 62-64, 2008.

VANDEPUTTE, PATRICK, SELENE FERRARI, AND ALIX T. COSTE. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

VARKA, E. M., AMPATZIDIS, C., KOSTOGLU, M., KARAPANTSIOS, T., DUTSCHK, V. On the use of electrical conductance measurements for the stability of oil-in-water Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 365, n. 1, p. 181-188, 2010.

VARKA, E-M., AND T. D. KARAPANTSIOS. Global versus local dynamics during destabilization of eco-friendly cosmetic emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 391, n.1, p. 195-200, 2011.

VEER, P., N. PATWARDHAN AND A. DAMLE. Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. **Indian journal of medical microbiology** v. 25, n. 1, p. 53, 2007.

WAGNER, D. K. AND P. G. SOHNLE. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews** v. 8, n. 3, p. 317-335, 1995.

WALDIA, S., B. C. JOSHI, U. PATHAK, M. C. JOSHI. The genus *Plectranthus* in India and its chemistry. **Chemistry & Biodiversity** v. 8, n. 2, p. 244-252, 2011.

WANG, L., LI, Z., LI, L., LI, Y., YU, M., ZHOU, Y., XU, Y. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of Cortex Dictamni in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 158, p. 207-215, 2014.

WHO – World Human Organization. Quality Control methods for medicinal plants materials. Geneva; 1998.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.** Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Acesso em: set. 2016.

WOLFORD, S. T., SCHROER, R. A., GALLO, P. P., GOHS, F. X., BRODECK, M., FALK, H. B., RUHREN, R. Age-related changes in serum chemistry and hematology values in normal Sprague-Dawley rats. **Fundamental and Applied Toxicology** v. 8, n. 1, p. 80-88, 1987.

XAVIER-JÚNIOR, F. H., SILVA, K. G. H., FARIAS, I. E. G., MORAIS, A. R. V., ALENCAR, E. N., ARAUJO, I. B., EGITO, E. S. T. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** v. 22, n. 4, p. 367-372, 2012.

YAKUBU MUSA, AKANJI MUSBAU ADEWUMI, OLADIJI ADENIKE TEMIDAYO. **Alterations in Serum Lipid Profile of Male Rats by Oral Administration of Aqueous Extract of Fadogia agrestis Stem**, 2008.

YANG, Y., M. E. LESER, A. A. SHER, D. J. MCCLEMENTS. "Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). **Food Hydrocolloids** v. 30, n. 2, p. 589-596, 2013.

YEOH, S. H., J. C. BELL, W. J. FOLEY, I. R. WALLIS, G. F. MORAN. Estimating population boundaries using regional and local-scale spatial genetic structure: an example in *Eucalyptus globulus*. **Tree genetics & Genomes** v. 8, n. 4, p. 695-708, 2012.

YUAN, Y.-W., D. J. MABBERLEY, D. A. STEANE AND R. G. OLMSTEAD. Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* (*Lamiaceae*): implications for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy. **Taxon** v. 59, n. 1, p. 125-133, 2010.

YUET PING, K., DARAH, I., CHEN, Y., SREERAMANAN, S., SASIDHARAN, S.. Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats. **BioMedical Research international**, p. 1-14, 2013.

ZANIN, J. L. B.; DE CARVALHO, B. A.; MARTINELI, P. S.; DOS SANTOS, M. H.; LAGO, J. H.; SARTORELLI, P. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

ZARENA, A., S. BHATTACHARYA, U. S. KADIMI. Mangosteen Oil-in-Water Emulsions: rheology, creaming, and microstructural characteristics during storage. **Food and Bioprocess Technology** v. 5, n. 8, p. 3007-3013, 2012.

ZHANG, K., B.-J. PARK, F.-F. FANG AND H. J. CHOI. Sonochemical preparation of polymer nanocomposites. **Molecules** v. 14, n. 6, p. 2095-2110, 2009.

ZHANG, X., J. LIU AND Z. FAN. Stability of etofenprox in water emulsion induced by block copolymer and surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 422, p. 191-198, 2013.

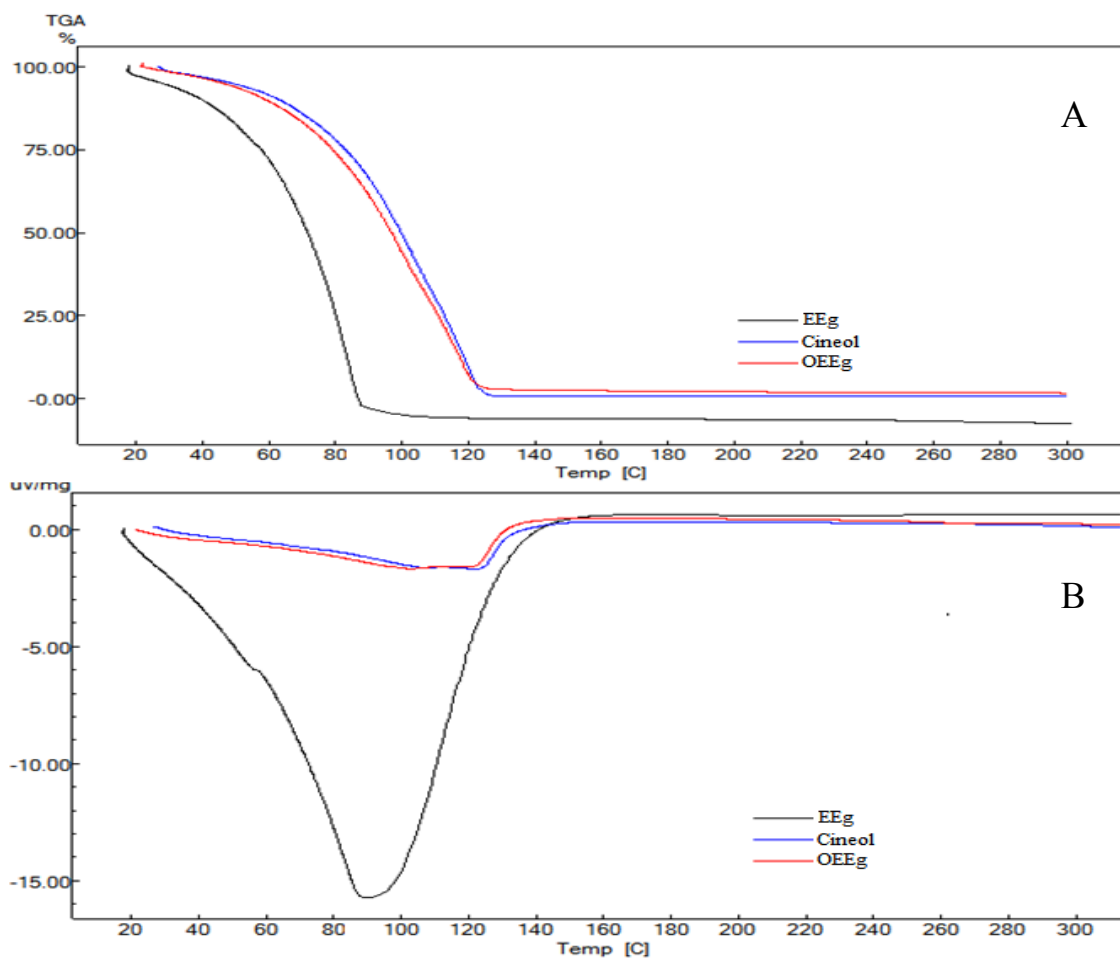
ZÜGE, L. C. B., C. W. I. HAMINIUK, G. M. MACIEL, J. L. M. SILVEIRA, A. DE PAULA SCHEER. Catastrophic inversion and rheological behavior in soy lecithin and Tween 80 based food emulsions. **Journal of Food Engineering** v. 116, n. 1 p. 72-77, 2013.

ZUNINO, GP. A Farmácia Magistral no contexto da saúde. **Pharmaceutical Brazilian**. v. 10, p. 59-60, 2007.

APÊNDICES

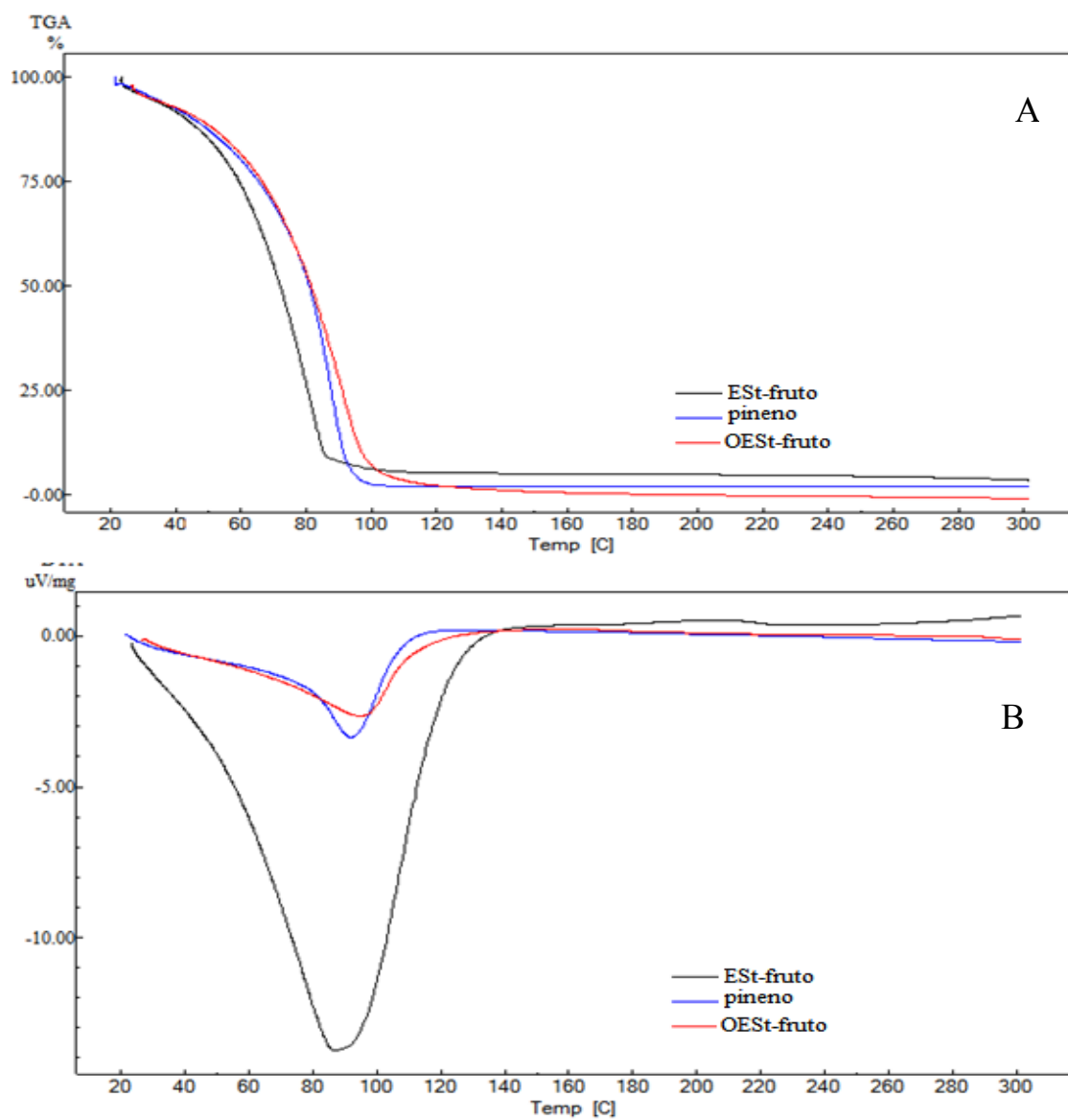
APÊNDICE A- CURVAS TERMOGRAVIMETRICAS (TGA) E CURVAS DE ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS, MARCADORES E EMULSÕES.

Figura 1 - Curvas A obtidas no TGA e curvas B obtidas no DTA, na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, para óleo essencial de *E. globulus* (OEEg), cineol e emulsões de *E. globulus* (EEg), respectivamente.



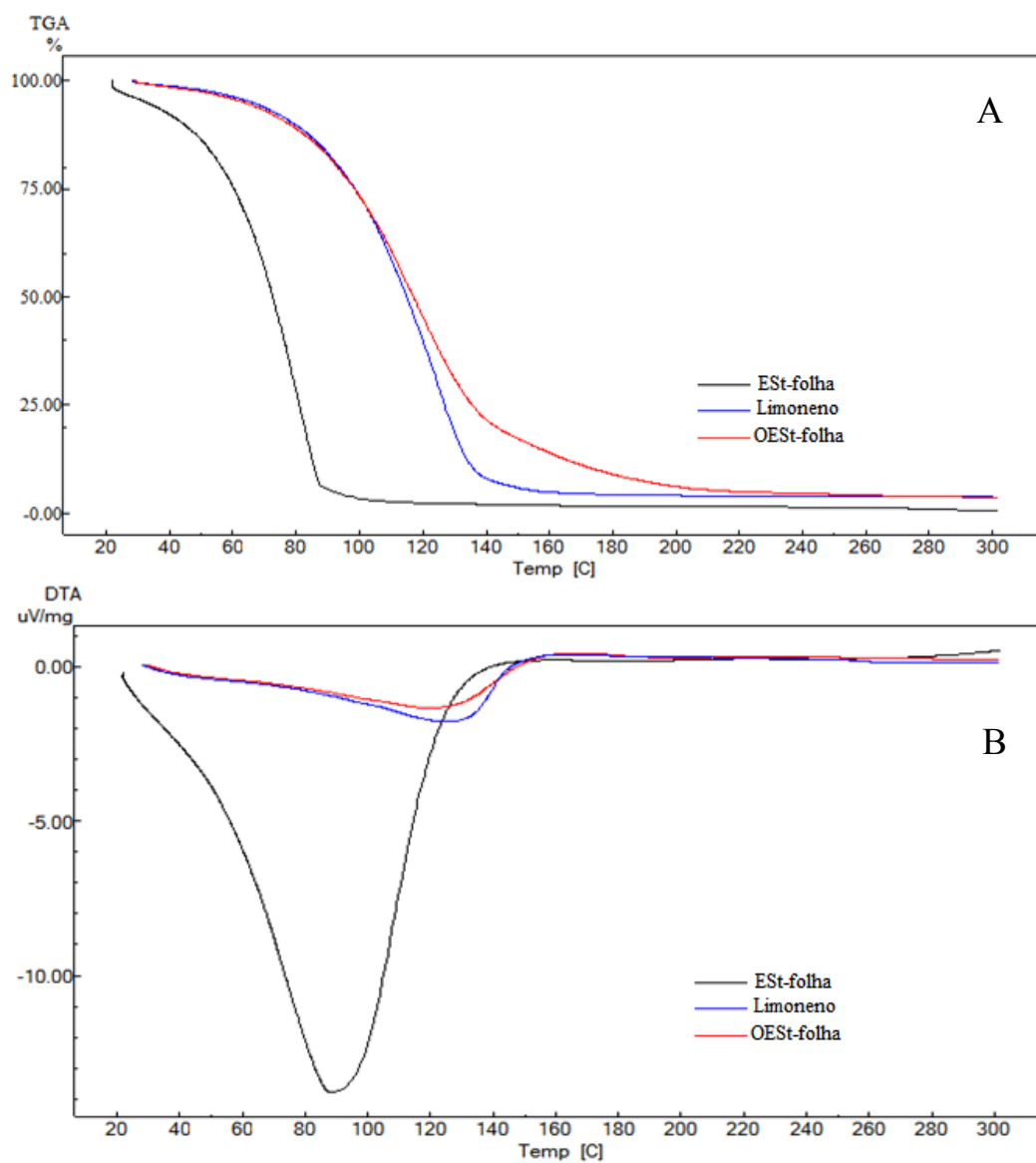
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2- Curvas A obtidas no TGA e curvas B obtidas no DTA, na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, para óleo essencial de *S. terebinthifolius* (fruto) (OEst-fruto), pineno e emulsão de *S. terebinthifolius* (fruto) (ESt-fruto), respectivamente.



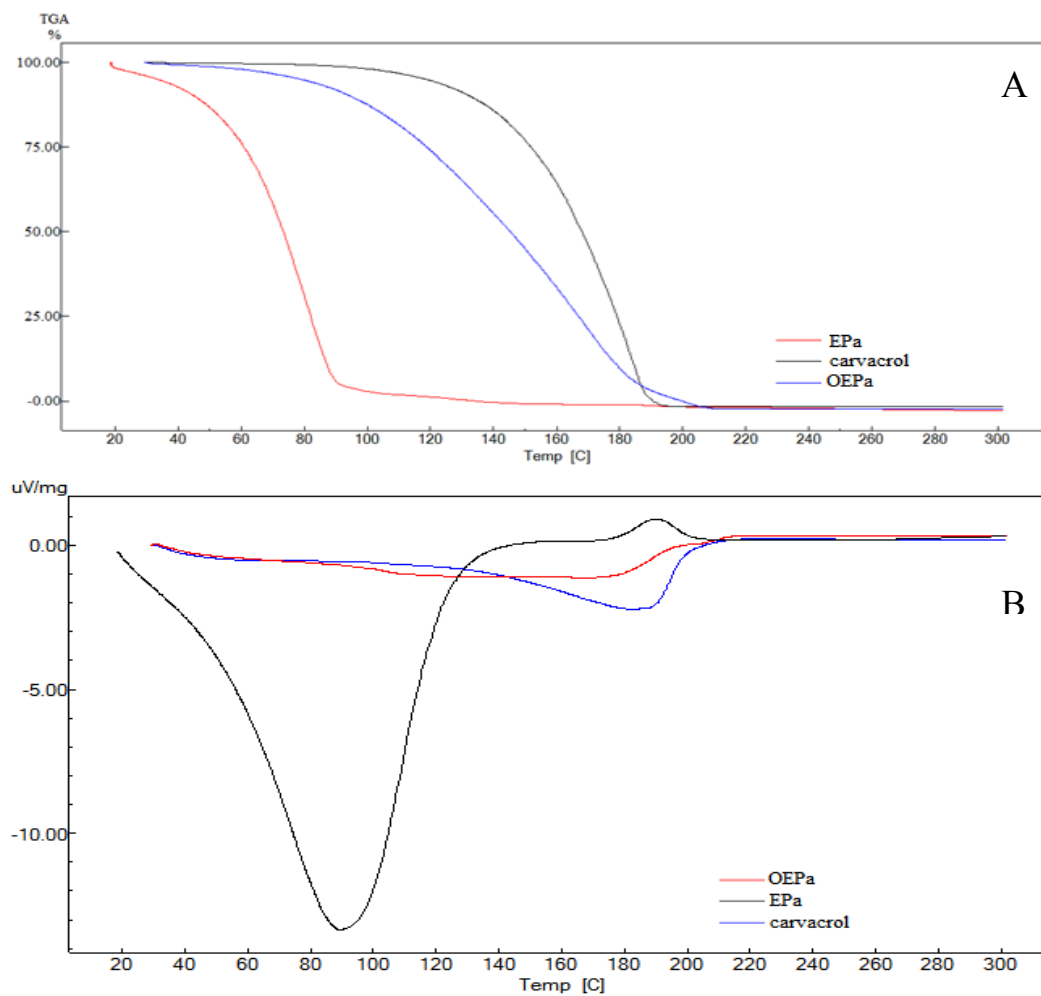
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3- Curvas A obtidas no TGA e curvas B obtidas no DTA, na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, para óleo essencial de *S. terebinthifolius* (folha) (OEst-folha), limoneno e emulsão de *S. terebinthifolius* (folha) (ESt-folha), respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4- Curvas A obtidas no TGA e curvas B obtidas no DTA, na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, para óleo essencial de *P. amboinicus* (OEPa), carvacrol e emulsão de *P. amboinicus* (EPa), respectivamente..



Fonte: Dados da pesquisa

APÊNDICE B- Technological Evaluation of Emulsions Containing the Volatile Oil from Leaves of *Plectranthus Amboinicus* Lour

¹Pablo Queiroz Lopes, ²Fabíola Bernardo Carneiro¹, ²Ana Letícia Braz de Sousa, ²Sócrates Golziodo Santos, ³Elquio Eleamen Oliveira, ⁴Luiz Alberto Lira Soares

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Rua Prof. Artur de Sá s/n, Recife, Pernambuco, Brazil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Cidade Universitária, João Pessoa - PB – Brasil

³Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, Rua Horácio Trajano de Oliveira, s/n, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Rua Prof. Artur de Sá s/n, Recife, Pernambuco, Brazil.

Revista: Pharmacognosy Magazine

JCR: 1.256

Qualis CAPES: B2

Status: PUBLICADO

Technological Evaluation of Emulsions Containing The Volatile Oil from Leaves of *Plectranthus Amboinicus* Lour

Pablo Queiroz Lopes¹, Fabíola Bernardo Carneiro¹, Ana Letícia Braz de Sousa², Sócrates Golziodo Santos², Elquio Eleamen Oliveira³, Luiz Alberto Lira Soares^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Rua Prof. Artur de Sá s/n, Recife, Pernambuco, ²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, ³Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, Rua Horácio Trajano de Oliveira, s/n, João Pessoa, Paraíba, ⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Rua Prof. Artur de Sá s/n, Recife, Pernambuco, Brazil

Submitted: 30-04-2016

Revised: 10-05-2016

Published: 06-01-2017

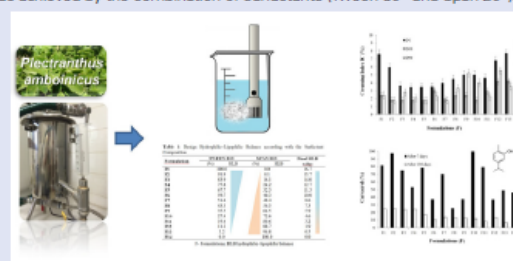
ABSTRACT

Background: *Plectranthus amboinicus* Lour is a species which is widespread throughout tropical countries where it is widely used against respiratory tract disorders such as bronchodilator, antitussive, and expectorant conditions. **Objective:** This study aims to characterize the essential oil of *P. amboinicus* (PaEO) and produce and evaluate emulsions containing PaEO. **Materials and Methods:** The essential oil was characterized by physical-chemical analyses for density, refractive index, 90% ethanol solubility, color, appearance, and identification by gas chromatography coupled to mass spectrometry detection. The emulsions were prepared following a hydrophilic-lipophile balance [HLB] spreadsheet design from two nonionic surfactants (Span 80® and Tween 20®) producing HLB values ranging from 4.3 to 16.7. The products were stored at room temperature at 5°C. The emulsion stabilities were tested both in the long and short-term. **Results:** The PaEO was obtained by steam distillation and the total extraction was reached after 3 hours yielding of 0.2% (w/w). This essential oil was characterized by physicochemical analyses for density [1.5 g.mL⁻¹], refraction index [0.9167], ethanol 90% solubility [1:2], color, and appearance (yellow/clear). Nineteen components were identified in the oil, among them the sesquiterpenes: carvacrol [33.50%], p-cymene [28.20%] and γ-terpinene [14.77%]. The emulsions obtained successfully showed, for the first time, HLB values for essential oils from *Plectranthus amboinicus* [15.7]. **Conclusion:** The experimental data shows a relationship between HLB values of the surfactant mixtures contributing to the emulsified systems production containing phytopharmaceuticals. Such an approach is of great importance to the development of lipid carriers for therapeutic drugs.

Key words: *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, essential oil, emulsion, stability

SUMMARY

- The essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus* was extracted by steam distillation and characterized.
- The emulsions containing essential oil were produced and the stability was performed in the short and long term.
- The critical hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of the essential oil was 15.7 and was achieved by the combination of surfactants (Tween 80® and Span 20®).



Abbreviations used: PaEO: essential oil of *P. amboinicus*, HLB: hydrophilic-lipophilic balance, CI: Creaming Index, MET: micro-emulocrit technique

Correspondence:

Dr. Luiz A. L. Soares,
Laboratory of Pharmacognosy,
Department of Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Pernambuco-UFPE,
Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária,
Recife-PE, Brazil,
E-mail: lals.ufpe@gmail.com
DOI: 10.4103/0973-1296.197646

Access this article online
Website: www.phcog.com

Quick Response Code:



INTRODUCTION

The species *Plectranthus amboinicus* Lour, also known as *Plectranthus aromaticus*, *Coleus aromaticus* and *Coleus amboinicus*, is a herbaceous plant. It is perennial, succulent and aromatic with brittle stems and ovate succulent leaves, an acute apex, toothed edges, and a thick petiole. This species is native to eastern Asia and it is widespread throughout the tropical countries.^[1]

P. amboinicus is widely used in Brazil in the treatment of diseases such as asthma, superficial mycosis, cancer, constipation, headache, cough, colds, fever, and digestive diseases.^[2-4] The literature also reports that the essential oil of the *P. amboinicus* acts as an antifungal and antibacterial agent.^[7,8] The essential oil of *P. amboinicus* presents a rich composition in mono and sesquiterpenes. In several studies, the carvacrol is reported to be the major component in a concentration ranging from 40 to 90%.^[6,9,10,11] Furthermore, other constituents have been reported such as eugenol,

methyl chavicol, β-caryophyllene, p-cymene, α-humulene, γ-terpinene, and 1,8-cineole.^[8,12]

Owing to its technological development, the emulsified systems containing essential oil, remain a challenge due to the volatility and instabilities and solubility of essential oil.^[13] In this way, the development of emulsions as carriers of essential oils demonstrates several benefits

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-Share Alike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

Cite this article as: Lopes PQ, Carneiro FB, de Sousa AB, Santos SG, Oliveira EE, Soares LA. Technological evaluation of emulsions containing the volatile oil from leaves of *Plectranthus Amboinicus* Lour. Phcog Mag 2017;13:159-67.

such as the ability to hide unpleasant flavors so they can be administered in a palatable form, and also to improve the oral bioavailability.^[14,15] Additionally, emulsions are widely used in cosmetic and pharmaceutical formulations due to excellent topical administration of hydrophilic and lipophilic active ingredients.^[16]

This study is aimed to produce and evaluate nonionic O/W emulsions based on the essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*. For this proposal the physicochemical and phytochemical characterizations of the essential oil were performed. To produce stable O/W emulsions, the HLB system was used to determine the HLB of the essential oil.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

A voucher specimen of the plant was identified and deposited in the Herbarium Lauro Pires Xavier of Federal University of Paraíba, with the reference numbers JPB 85943 and JPB 85944.

Extraction and characterization of the essential oil from *p. amboinicus*

The fresh leaves of *P. amboinicus* were extracted by steam distillation using the Linax extractor (model D2 Mini, São Paulo, Brazil). The leaves were transferred to the reservoir, which features a continuous water cycle coming directly from the water system. This water was not in contact with the sample, the water vapor was passed through the reservoir, which contains the leaves, and drags down the volatile constituents. The samples were stored in glass vials under refrigeration to prevent possible losses of volatile constituents. Different extraction times [1 to 6 h] were used to optimize the estimate of the best yield.

Physical properties of the *P. amboinicus* essential oil (PaEO)

Relative density

The relative density was determined by calculating the ratio between the mass and the volume of the sample at 20°C (Eq. 1), used in the previously calibrated 5ml pycnometer with distilled water at 20°C. The analysis was performed in triplicate.

$$d_{20}^{20} = \frac{m}{v} \text{ (Eq.1)}$$

Where: d = density (g.ml⁻¹); m = mass and v = volume

Refractive index

The refractive index was determined by using a Reichert refractometer [AR-200, California, USA]. The oil samples were put directly over the prism of the refractometer at 25°C. The analysis was performed in triplicate.

Solubility

A solution of ethanol in water 90% (v/v) was used to determine the essential oil solubility. To maintain the constant volume of essential oil (0.5 ml), an alcoholic solution was added in equal quantities to the essential oil until the complete solubilization of the essential oil was achieved.^[17] The analysis was performed in triplicate.

Gas chromatography - mass spectrometry analyses

The identification of the PaEO components was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry detection in Ultra GC-MS (Shimadzu, Kyoto, Japan). The autosampler was an AOC-20 series injector (Shimadzu), the gas chromatograph was a GC-2010 Plus (Shimadzu), the mass spectrometer was a GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) and ion trap detector (MS, model 4000) (Shimadzu), with electron ionization-mass spectrometry (EI-MS 70 eV). The analysis

was developed in a Rtx®-5MS (Restek, Bellefonte, PA, USA) capillary column (Shimadzu), 30 m long, with a 0.25 mm thickness and 0.25 mm i.d. with Helium at 1 ml/min as carrier gas. Temperature program: injector at 250°C with a column-oven from 60 to 240 °C at 3 °C/min. The retention index (RI) was calculated for all the volatile constituents using an n-alkane homologous series, ranging from C8 to C40, using a linear temperature programmed equation.^[18] The individual components were identified by comparing the mass spectra and GC retention data with those of authentic compounds previously analyzed and stored in the database from the National Institute of Standards and Technology (NIST). The interpretation of RI values was assisted by the FFNSC (Flavor and Fragrance Natural and Synthetic Compounds) Library.^[13]

Development and evaluation of emulsion systems containing PaEO

Hydrophilic-lipophilic balance spreadsheet design

The emulsions were prepared following the spreadsheet design shown in Table 1. This spreadsheet includes two surfactants: one of a lipophilic nature [Span 80®, HLB=4.3] and the other of a hydrophilic nature [Tween 20®, HLB=16.7]. The final HLB value of each system varied according to the relative proportion of each surfactant.^[19]

Preparation of the emulsions

The emulsions were obtained by the phase inversion temperature method.^[19] The preparation of W/O emulsions by the PIT method is a widely used technique in obtaining emulsified systems, in particular, emulsions containing the essential oil.^[20-25] According to studies presented by Esquena, Sankar,^[26] the PIT method requires the system whose phase inversion temperature is above the freezing point of water, and below the temperature where degradation of substances occurs. This can be achieved by choosing the surfactant with the nonionic appropriate HLB value for the system. The oil in water emulsion composition was 5% (w/w) of PaEO, 2% (w/w) of surfactants, and 93% (w/w) of water. Initially, the continuous phase was prepared by dispersing the required Tween 20® in distilled water. The dispersed phase was obtained by adding Span 80® into the essential oil. Both phases were heated separately to 70°C and one phase dispersed within the other. The studies report the

Table 1: Design hydrophilic-lipophilic balance according with the surfactant composition (%).

Formulation	TWEEN 20®		SPAN 80®		Final HLB value
	(%)	HLB	(%)	HLB	
F1	100.0	16.7	0.0	0.0	16.7
F2	91.9	15.4	8.1	0.3	15.7
F3	83.9	14.0	16.1	0.7	14.7
F4	75.8	12.7	24.2	1.0	13.7
F5	67.7	11.3	32.3	1.4	12.7
F6	59.7	10.0	40.3	1.7	11.7
F7	51.6	8.6	48.4	2.1	10.7
F8	43.5	7.3	56.5	2.4	9.7
F9	35.5	5.9	64.5	2.8	8.7
F10	27.4	4.6	72.6	3.1	7.7
F11	19.4	3.2	80.6	3.5	6.7
F12	11.3	1.9	88.7	3.8	5.7
F13	3.2	0.5	96.8	4.2	4.7
F14	0.0	0.0	100.0	4.3	4.3

F-Formulations; HLB- hydrophilic-lipophilic balance

use of up to 70°C to obtain emulsions containing essential oil.^[11,19,21,22,27-30] The final emulsions were obtained after homogenization using an Ultra-Turrax [IKA, model T-18, Frankfurt, Germany] at 15,500 rpm for 10 min. Two batches of 14 emulsions with varying HLB values [Table 1] were obtained and stored at 25 ± 2°C and 5 ± 1°C in tube assay to evaluate the IC. Furthermore, 14 flasks of 50ml each, were stored at room temperature to complete the pH and conductivity tests.

Characterization of the emulsions

Creeping index

The creeping rate was determined experimentally by the measurement of the creeping index (CI) from Eq.2. The CI values were obtained from the ratio between the total height of cream layer (CC) and the total height of emulsion layer (CT). CC and CT were measured directly into a storage glass flask with the help of a graduate scale.

$$\%CI = \frac{CC}{CT} \cdot 100 \text{ (Eq.2)}$$

pH

The measurements of pH were obtained from the probe inserted directly into the emulsion container at room temperature. The values were obtained using a pre-calibrated pH meter (model PG1800, São Paulo, Brazil). The analysis was performed in triplicate.

Conductivity

The conductivity was measured by directly inserting the probe into an emulsion container at room temperature, using a portable conductivity meter [MITE, model CD30] previously calibrated with a standard solution of 0.1 N KCl. The analysis was performed in triplicate.

CG-FID analysis

The quantification studies were performed on a Shimadzu Gas Chromatograph (model GC-2010 Plus, Kyoto, Japan) equipped with a capillary column DB-1 dimethylpolysiloxane (30mx 0.25 mm, 0.25 micron), and a flame ionization detector was used to analyze the samples.^[31] The carrier gas was N₂ with a flow of 1.3 ml/min., split 1:100, injector temperature 260°C, detector temperature 280°C, initial column temperature equal to 60°C heated at a rate of 10°C. min⁻¹ up to 92°C for 3 minutes, followed by a heating rate of 10°C/min up to 120°C and a rate of 20°C/min up to 280°C. The injection volume was 1.0 µl. The calibration curve from a commercial sample of carvacrol [Sigma-Aldrich, Chicago, IL, USA] was obtained by recording the peak areas against the known injected amount contained in the same injected volume (1 ml). The analysis was performed in triplicate.

Stability studies

Long-term stability

The macroscopic aspect, CI, pH, and conductivity were evaluated on storage days 1, 3, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180. The samples were stored at room temperature (25 ± 2°C) and at a low temperature (5 ± 1°C). These parameters enabled the evaluation of the emulsion system stability and therefore the prediction of the chemical stability of the components of the emulsion.

Short-term stability

The short-term stability was evaluated by the micro-emultocrit technique (MET).^[32] The formulations were stored in closed containers at room temperature and were not homogenized before testing. The heparin-free capillary tubes were filled to 75% with each formulation and placed in a micro-centrifuge (Quimis, model Q10.500, São Paulo, Brazil) at 10,500 rpm for 10 min. The evaluation was realized at room temperature on the storage days 1 (D1), 30 (D30) and 90 (D90). After the centrifugation cycle, the IC calculations were performed in accordance with (equation 2).

The short-term stability realized by the micro-emultocrit technique revealed not only, that the emulsion stability was highly influenced by the gravity acceleration, but also managed to predict influences provided in the HLB values. The Stability measurements were made in triplicate for each of the three days.

Statistical analysis

The mean, standard error of the mean, test-t and graphics were calculated by using SigmaPlot v.10.0 [Systat, USA], and *p*<0.05 was considered to be statistically significant

RESULTS AND DISCUSSIONS

Extraction and characterization of the essential oil

The essential oils extraction conditions are important as they are one of the main physical and chemical parameters which are directly related to the quality of the essential oil. A rapid distillation can lead to a product containing predominantly volatile constituents with better organoleptic and chemical characteristics. However, a prolonged extraction of the product makes the process more expensive and can also increase the amount of less desirable compounds.^[33,34] In our study, the PaEO extraction was performed in a period from 1 to 6 hours [Figure 1]. The data showed higher extraction efficiency after 3 hours. After that, the extractions from three hours, showed constant behavior. Under these conditions, 0.9 ml of PaEO was obtained from 2 kg of fresh leaves of *P. amboinicus*.

The higher yield was obtained after 3 hours of extraction. Thus, 0.9 ml of PaEO was extracted from a mass of 2 kg of plant fixed to 2 l of distilled water at 100°C. The yield was 0.067% ± 0.3 [n= 3] relative to the weight of fresh material according to the Equation.^[3]

$$\%Yield = \frac{v.d.100}{m} \text{ (Eq.3)}$$

Where: d = density (g.ml⁻¹); m= mass (g) and v = volume (ml)

The extraction performance is in accordance with the essential oil content report in the literature for this herbal drug.^[35,36]

The essential oil characterization plays an important role in the establishment of quality specifications for the quality control for industrial production of herbal products. The full characterization (physico-chemical), including chemical profile and thermal profile, as well as the biological activity of the essential oils according to their toxicological or pharmacological properties contributes to improving safe and effective therapeutic use of the species.^[37,38] *Plectranthus* is a genus with an economic potential in various sectors, and it is attracting attention due to its medicinal value. A large number of species are not toxic and so may be taken orally, whilst others can be used topically on the skin. It is a promising plant for the development of medication.^[1,39] The essential oil of *P. amboinicus* (PaEO) was characterized by determination of its physicochemical properties such as relative density, refractive index, and solubility in 90% ethanol.

The essential oil, obtained from *P. amboinicus* leaves, presents itself as a clear yellow liquid with strong aromatic odor and the physicochemical properties as summarized in Table 2.

Generally, oil yield and chemical composition are taxon-dependent and are strongly influenced by several factors, including harvest date, storage,

Table 2: Physical properties of the essential oil extracted from leaves of *P. amboinicus* (PaEO).

Physicochemical Properties	PaEO
Density (g.ml ⁻¹)	1.5 ± 0.03
Refractive index (N _D 25°)	0.9167 ± 0.04
Solubility in 90% ethanol (v/v)	01:02 ± 0.07
Yield (%)	0.2 ± 0.06

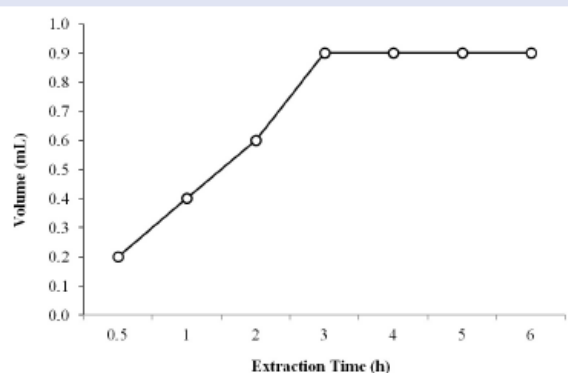


Figure 1: The extraction performance of the essential oil from the leaves of *P. amboinicus*.

environment, stage of maturity, and tested plant parts.^[40] Therefore, the products marketed are usually obtained from pools of several oil charges to achieve some uniformity. Nevertheless, comparing the results obtained in this work with the literature, it could be observed that there are similarities among some quality parameters analyzed, such as: relative density, refractive index, and solubility in ethanol.^[41,42]

Identification of components by GC/MS

The identification of the chemical constituents of the PaEO performed by GC-MS as well as the percentages, retention time and Kovats Index; are presented in Table 3. The chromatographic data allowed the identification of 19 components, corresponding to 99.99% of the total oil composition. The main constituents were carvacrol [33.5%], *p*-cymene [28.20%], γ -terpinene [14.77%], *E*-caryophyllene [4.63%], acid phthalic [4.32%], γ -bergamotene [3.16%], α -terpinene [2.52%], and β -myrcene [2.03%].

The qualitative data of the major compounds are in agreement with data previously reported for *Plectranthus* sp. oils from Brazil.^[35] However, the quantitative data were different for: carvacrol [33.5%], *p*-cymene [10.3%], and γ -terpinene [5.9%]. Other studies on the composition of the *P. amboinicus* oil also showed carvacrol as the main constituent, but the concentrations ranged from 28.65% to 90-98%.^[6,8,43,44] The variations observed among the various reports can be attributed to the methodology used in the extraction process, seasonal variations, soil type, climate, genetic aspects, and geographical variations of plant.^[8] According to Haddouchi, Chaouche^[31] the knowledge about essential oil composition is fundamental in its correct application as a bioactive product. To control the types of components and the essential oil yield in the plant, it is necessary to standardize the cultivation conditions as well the harvest and postharvest procedures. Thus, the extraction of high quality essential oils is feasible.^[45]

Development and evaluation of emulsions containing essential oil from *P. amboinicus*.

The essential oils, obtained from different plant species, have been extensively studied as bioactive products for therapeutic purposes in the pharmaceutical industry due to their antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, and repellent properties.^[46,47] Furthermore, essential oils have showed lower toxicity and resistance in comparison to synthetic products.^[48] On the other hand, the chemical complexity and variability of the herbal matrix, in addition to other deleterious properties such as susceptibility to degradation, volatility and, water insolubility, makes the technological development of pharmaceutical systems to improve

Table 3: Percentage chemical composition of the essential oil from leaves of *P. amboinicus* by gas chromatography-mass spectrometry.

Peak	Compounds	R _t min.	Area (%)	KI
1	α -Thujene	5.757	0.83	9.275.044
2	α -Pinene	5.969	0.38	9.350.088
3	Camphene	6.392	0.11	9.499.823
4	Vinyl amyl carbinol	7.170	0.74	9.775.221
5	β -Myrcene	7.567	2.03	9.915.752
6	α -Phellandrene	8.068	0.31	10.069.947
7	α -Terpinene	8.480	2.52	10.179.521
8	<i>p</i> -Cymene	8.783	28.2	10.260.106
9	Limonene	8.921	0.84	10.296.809
10	γ -Terpinene	10.04	14.77	10.594.415
11	α -Terpinolene	11.190	0.19	10.900.266
12	Linalool	11.599	0.15	11.007.907
13	L-4-terpineol	14.972	1.52	11.792.326
14	Carvacrol	20.608	33.5	13.065.455
15	<i>E</i> -Caryophyllene	25.710	4.63	14.233.216
16	γ -Bergamotene	26.352	3.16	14.384.452
17	α -Humulene	27.162	1.17	14.575.265
18	Caryophyllene oxide	32.558	0.62	15.878.484
19	Acid Phthalic	43.094	4.32	21.647.484

R_tmin. - Retention Time (min.); KI - Kovats Index

the oil characteristics fundamental, in order to assure the biological properties and its effectiveness.^[49]

The emulsions can improve stability and the biopharmaceutical profile of essential oils, as well as provide protection against oxidation, and allow for the introduction of technological adjuvants in a formulation.^[50]

These systems are defined as heterogeneous mixtures that consist of droplets of a liquid dispersed in a second continuous immiscible liquid phase forming a thermodynamically unstable system. To produce stable emulsions, surfactants are added to the system.^[21,30] The selection of the surfactant used is fundamental in the production of formulations with a good stability. The first step in the selection of the correct surfactants for the emulsion system is the identification of the HLB value of the oil fraction. The concept of the hydrophile-lipophile balance [HLB] was first described by Griffin^[51] and is used as a semi-empirical scale for selecting surfactants to form stable emulsions. A well established methodology to identify the HLB of essential oils is the study of long-term stability of a bath of emulsions produced with the essential oil, and ranging the HLB value of the surfactants.^[19] The HLB value of the more stable emulsion is considered the HLB of the essential oil.

Long-Term stability study

The PaOE containing emulsions were evaluated for a period of 180 days to assess the stability of the systems. In spite of the various HLB values of the formulations, the process of emulsification by phase inversion was able to produce stable emulsions with a milky aspect and which remained stable on the day of preparation.

As expected, the emulsions showed different behavior to creaming during the storage time, according to the concentration of the emulsifying agent used. The cream index (CI) reflects the emulsion stability by measuring the height of the separated cream layer with

time, but also indirectly demonstrates the process of separation of droplets in the creaming.^[52]

The studies by Guerra-Rosas, Morales-Castro,^[53] showed that after the emulsification, the droplets migrate to the surface of the sample (coalescence) after a few hours of emulsification, forming a layer of cream. Consequently, there is a decrease of the CI over storage time in which the emulsion is preparing for phase separation.

The emulsions at room temperature showed significant creaming formation in the first 24 h (D1) [Table 4]. As the storage period increases, the emulsions showed a gradual increase in the creaming index (CI). The emulsions F5, F6, F7, F8, F9, F10, and F11 showed a phase separation process after 120 days. Therefore, phase separation of the emulsion F12 and F13 in D180 demonstrated instability of these formulations. The F14 formulation showed a high CI in D180. On the other hand, there was no phase separation of emulsions for F1, F2, F3, and F4. However, among these emulsions, the F1 had the lowest rate of creaming [Table 4].

When comparing the formulations at ambient temperature with 5°C, the temperature influences on stability were observed.^[54] According to studies conducted by Hosseini, Jafari^[55] and Leal, Sousa,^[29] high temperatures promote a high frequency of collisions of the droplets, speeding up physical-chemical and chemical reactions, favoring the coalescence process resulting in a lower stability of the emulsions.

The formulations stored at 5°C presented a better stability when compared to the formulations stored at room temperature [Table 5].^[56] There was an increase of IC with increasing storage time in the formulations. However, the emulsions F1, F2, F3, F4, and F5 showed the least CI, and the formulation F2 had the lowest CI, proving to be the most stable at the temperature 5°C [Table 5].

Determination of pH

The measurements of pH were obtained from the probe inserted directly into the emulsion container. The evaluation of the pH values has the objective to investigate changes that affect the stability of the formulation. The pH values for emulsions stored at room temperature indicated no important influence on the surfactant composition. However, the storage time promoted a decrease in the pH for all formulations. Throughout the experimental period, the pH of all the formulations reduced, as well as the pH range between the formulations also reduced 2.5-4 (D180) [Figure 2]. The range of values may indicate the occurrence of undesirable chemical

reactions or degradation of the products which could be attributed to a possible oxidation in the oil.^[19,21,57] This result indicates that all formulations showed loss or degradation of the essential oil.

Conductivity

According to Masmoudi, Le Dréau,^[58] modifications could be observed to the conductivity values of the emulsions before seeing the instabilities of the systems. Studies by Bernardi, Pereira^[59] observed modifications to the conductivity values of the emulsions before seeing the instabilities of the systems. The studies by Abdullah, Abdulkarim^[60] and Mahmood and Akhtar^[61] attributed the continuous increase of conductivity values to the process of coalescence of the internal phase. This was followed by a reduction, which may be attributed to phase separation. Nevertheless, F1 and F2 presented an increase in conductivity during all the experiment, and they were the only formulations that did not have a decrease in conductivity during the period of 180 days [Figure 3]. Furthermore, F2 showed a lower value in conductivity than F1 and a better stability.

Short-term stability

The results presented in Figure 4 suggest that the method was able to detect not only the major influence of the centrifugal stress but also the individual contribution of each HLB [surfactant composition] on the system stability.

The micro-emultocrit technique (MET) was first described by Macedo, Fernandes,^[32] as an appropriate tool to evaluate and predict influences provided by small variations in the HLB values on emulsions. Thus, besides the simplicity, the ability to use a low amount of sample and with a short time of execution made this method an excellent tool to evaluate and/or optimize formulation parameters and their respective HLB values. The results of the short term stability study are shown in Figure 4. Regarding the creaming index data, the lowest CI rates were observed at time D1 for the formulations F3, F4, F5 and F6, where CI were 3.62%, 3.43%, 3.47%, and 3.51%, respectively. After 30 days (D30), lower CI were observed for F1, F2, F3, F4, and F5 (2.42%, 1.88%; 1.81%; 1.83% and 1.78%, respectively). And, on the last day of analysis (D90), the CI for F1, F2, F3 and F4 were 2.43%, 1.75%; 2.9%, and 1.73% respectively.

By comparing the values obtained by the micro-emultocrit technique it became apparent that the results for formulations containing PaEO

Table 4: Analysis of creaming index (%) for the long-term stability study at room temperature.

Formulations	HLB	D1	D3	D10	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180
F1	16.7	2.44	3.66	6.17	6.17	6.25	6.41	6.67	6.85	5.71	5.80
F2	15.7	2.41	5.06	6.41	6.41	6.58	6.85	7.14	8.82	7.69	8.20
F3	14.7	5.00	5.00	7.69	7.69	7.89	8.11	7.14	7.25	7.58	6.25
F4	13.7	5.13	6.41	6.41	5.13	6.58	8.00	6.85	6.94	7.25	7.46
F5	12.7	5.13	6.41	6.58	6.67	6.76	8.45	5.97	PS	PS	PS
F6	11.7	4.88	6.10	7.41	7.50	7.59	9.09	5.41	PS	PS	PS
F7	10.7	3.90	5.19	6.67	5.33	6.76	8.22	5.71	PS	PS	PS
F8	9.7	5.00	6.25	7.50	7.69	7.79	9.21	6.85	PS	PS	PS
F9	8.7	5.13	5.13	6.41	7.79	7.89	6.67	6.94	PS	PS	PS
F10	7.7	3.75	5.00	6.49	6.76	8.82	10.17	8.93	PS	PS	PS
F11	6.7	3.75	5.00	7.59	7.69	7.79	9.21	8.11	PS	PS	PS
F12	5.7	3.75	5.00	8.86	7.69	7.79	6.67	9.46	9.86	9.87	PS
F13	4.7	1.23	2.47	6.25	6.33	6.41	9.33	10.96	9.86	8.82	PS
F14	4.3	2.50	3.80	6.41	7.79	7.89	8.22	11.43	11.94	7.81	13.11

F - formulation; D - day; HLB - hydrophilic-lipophilic balance; PS - phase separation.

Table 5: Analysis of creaming index (%) for the long-term stability study at 5°C degree.

Formulations	HBL	D1	D3	D10	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180
F1	16.7	2.44	3.66	6.17	6.17	6.25	6.41	6.67	6.85	5.71	5.80
F2	15.7	2.41	5.06	6.41	6.41	6.58	6.85	7.14	8.82	7.69	8.20
F3	14.7	5.00	5.00	7.69	7.69	7.89	8.11	7.14	7.25	7.58	6.25
F4	13.7	5.13	6.41	6.41	5.13	6.58	8.00	6.85	6.94	7.25	7.46
F5	12.7	5.13	6.41	6.58	6.67	6.76	8.45	5.97	PS	PS	PS
F6	11.7	4.88	6.10	7.41	7.50	7.59	9.09	5.41	PS	PS	PS
F7	10.7	3.90	5.19	6.67	5.33	6.76	8.22	5.71	PS	PS	PS
F8	9.7	5.00	6.25	7.50	7.69	7.79	9.21	6.85	PS	PS	PS
F9	8.7	5.13	5.13	6.41	7.79	7.89	6.67	6.94	PS	PS	PS
F10	7.7	3.75	5.00	6.49	6.76	8.82	10.17	8.93	PS	PS	PS
F11	6.7	3.75	5.00	7.59	7.69	7.79	9.21	8.11	PS	PS	PS
F12	5.7	3.75	5.00	8.86	7.69	7.79	6.67	9.46	9.86	9.87	PS
F13	4.7	1.23	2.47	6.25	6.33	6.41	9.33	10.96	9.86	8.82	PS
F14	4.3	2.50	3.80	6.41	7.79	7.89	8.22	11.43	11.94	7.81	13.11

F - formulation; D - day; HBL - hydrophilic-lipophilic balance.

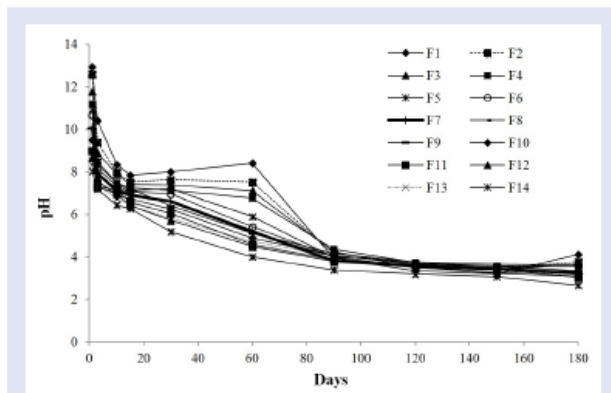


Figure 2: pH curves versus days for formulations (F) stored at room temperature.

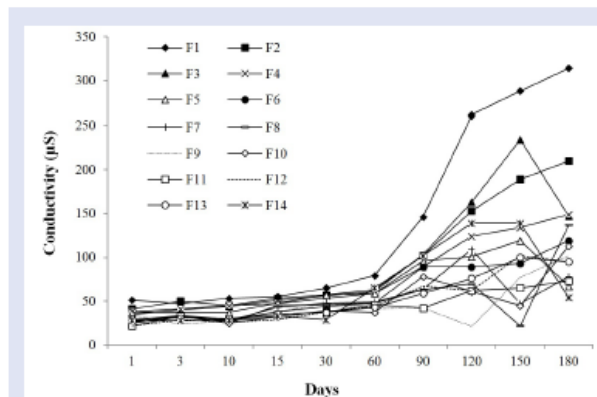


Figure 3: Conductivity curves versus days in accordance with the formulations (F) stored at room temperature.

between the days (D1, D30 and D90) showed a statistically significant difference between the formulations, when $p < 0,05$.

According to Franzol and Rezende,^[62] to obtain emulsions there is a need to introduce energy in the emulsified systems, presenting very agitated droplets in the first days. This is because the emulsified system has free energy in the first days of storage which can lead to altered results. Thus, the study was conducted using the micro-emultocrit technique on three different days, where it was observed that the day D1 showed instability in relation to D30 and D90, possibly because free energy still existed in the system. The formulations on D30 and D90 had greater stability, because free energy had already dissipated promoting a kinetic

stabilization. It was noted that F2 is the most stable formulation due to lower IC, based on the static data.

Quantitative analysis of carvacrol in emulsion

The quantitative analysis plays an important role in the pharmaceutical field throughout the production process from quality control to finished product to achieve a quality standard required for a drug.^[63] This approach becomes more critical and challenging when complex materials such as biological matrix are used as active ingredients. Regarding the essential oils in which the chemical complexity is followed by adverse physico-chemical properties, the quantitative

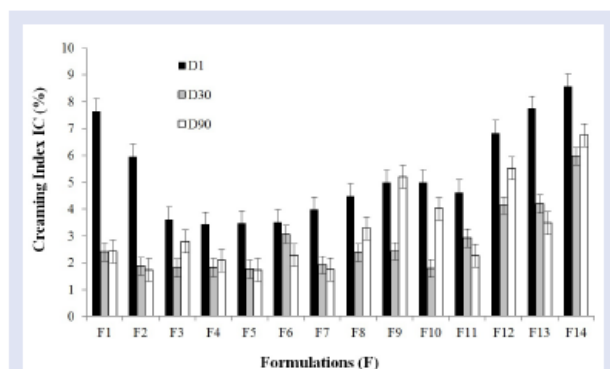


Figure 4: Analysis of creaming index [CI %] for the formulations containing essential oil *P. amboinicus* stored at room temperature. The short-term stability study performed by the micro-emultocrit technique in the days (D) 1, 30 and 90.

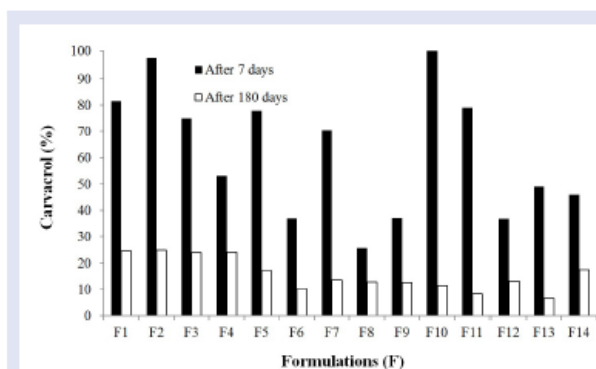


Figure 5: The quantitative analysis of carvacrol in emulsions containing essential oil *P. amboinicus*. The analysis was realized after 7 and 180 days stored at room temperature.

evaluation is used both as an indication of stability and measurement of technological success. According to Lukhoba, Simmonds,^[1] and Ruzsiková, Součková,^[64] the drug quantitative analysis facilitates development of medicines.

The chemical control of the emulsions was performed by the quantitative analysis of the Carvacrol, which is the major constituent of the PaEO. The contents of the chemical marker were assayed by GC, and the PaEO contents in the emulsions were evaluated, also indicating the emulsions stability. The contents of the chemical marker for each formulation were evaluated after 7 and 180 days of storage at room temperature [Figure 5]. The quantification of Carvacrol in the emulsions was carried out only at room temperature because volume loss was observed, unlike with emulsions, which are stored at 5°C. The proportions of PaEO entrapped in emulsified systems were estimated from the total volume of essential oil added to each formulation.

After 7 days, the percentages of carvacrol present in the emulsions were ranged from 25.6% to 100.00%. Maximum carvacrol content was observed in the formulations F2 [97.38%] and F10 [100.00%]. Regarding the content of carvacrol after 180 days, an important decrease was observed. The content reduction ranged from 50.3% to 89.6%, for formulations F8 and F11, respectively.

The F1, F2, F3, and F4 emulsions, which had the highest values of HLB, showed the highest carvacrol content after 180 days. Thus, this showed that the most stable formulations are those which showed higher HLB values and the highest levels of carvacrol. According to studies by Viana, Bohrer,^[65] the HLB system is based on surfactants, which are amphiphilic compounds whose molecules are in the hydrophilic and lipophilic groups. The higher HLB values are assigned to more hydrophilic surfactants in which the hydrophilic groups are more suitable for the production of O/W emulsions. In fact, the essential oil properties presented a volatility which could explain the difficulty of oil entrapment and retention.

CONCLUSION

The development of emulsions containing essential oil remains a technological challenge, specifically in the improvement of their topical applicabilities. However, in the present work the feasibility of production of disperse systems was demonstrated using only the essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus* in the disperse phase, and its HLB value was described for the first time. Accordingly, the combination of surfactants [Span 80® and Tween 20®] leads to a required HLB value of 15.7.

To summarize, the present work demonstrated the feasibility of emulsion containing essential oil extracted from leaves of *P. amboinicus*. However, further biological studies are necessary to evaluate the activity of the PaEO containing emulsions, as well as the study of cutaneous permeation for topical use, as well as the definitive dose to be administered.

Acknowledgement

The authors thank the CNPq, FACEPE, UEPB, UFPB, and UFPE for their support. The authors are also grateful to Andrew Alastair Cumming for editing this paper.

Financial support and sponsorship

This work was supported by the CNPq [480128/2012-0, 302113/2012-6] and FACEPE [APQ-0363-. 4.03/13, APQ-0493-4.03/14].

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

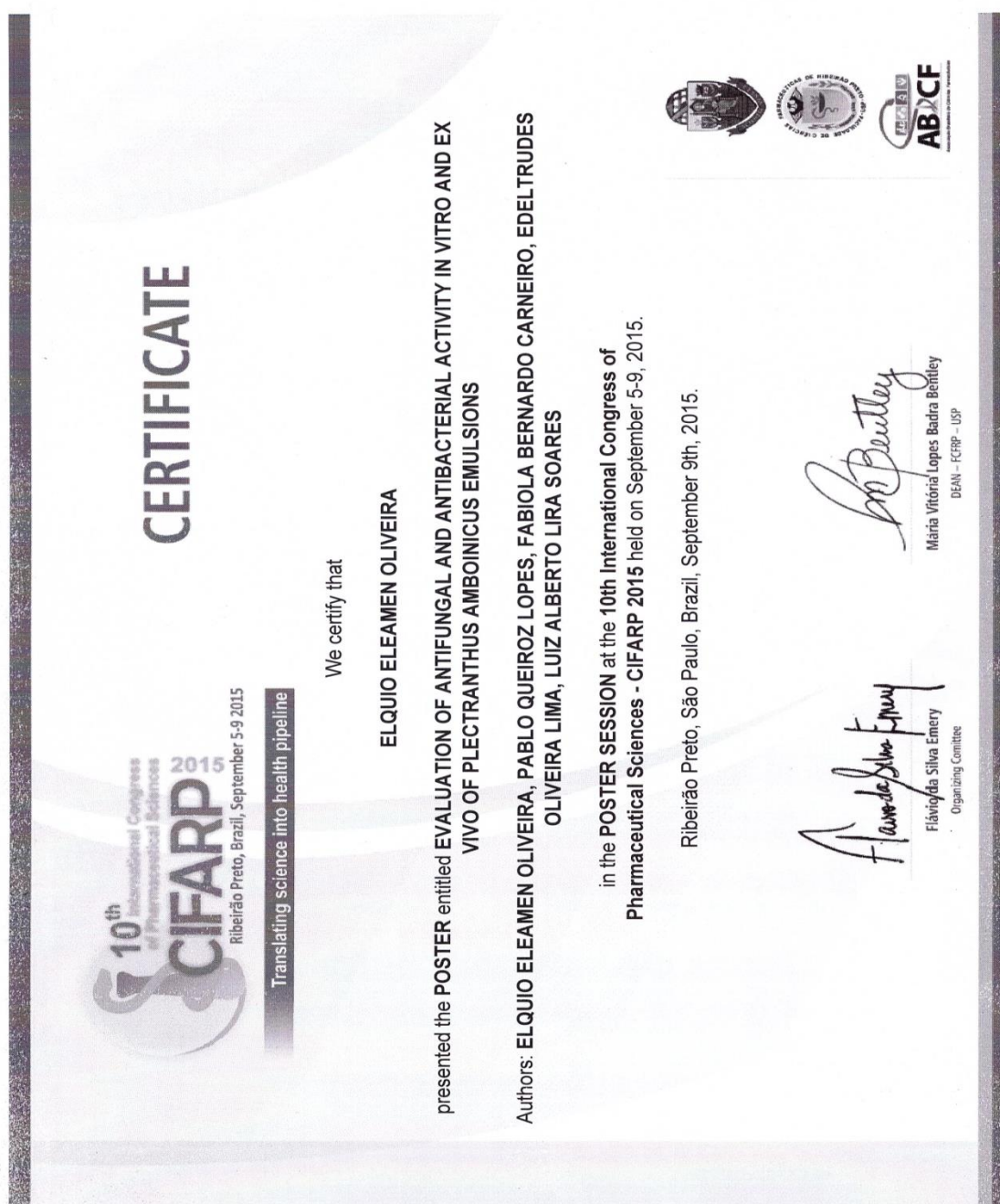
- Lukhoba CW, Simmonds MS, Paton AJ. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *J Ethnopharmacol* 2006;103:1-24.
- Morais SM, Dantas J da Silva ARA, Magalhães EF. Ethno-medicinal plants of Tapeba Indians from the State of Ceará-Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2005;15:169-77.
- Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KR, Trajano VN, *et al.* Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. *Rev Bras Farmacogn* 2007;17:186-90.
- Nogueira JCR, Diniz MFM, Lima EO. *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74:118-24.
- Gurgel APAD, da Silva JG, Grangeiro ARS, Oliveira DC, Lima CMP, da Silva ACP, *et al.* *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol* 2009;125:361-3.
- Gonçalves TB, Braga MA, de Oliveira FF, Santiago GM, Carvalho CB, e Cabral PB, *et al.* Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine* 2012;19:962-8.
- Manjmalai A, Alexander T, Grace VM. Bioactive evaluation of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* by GC-MS analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012;4:205-11.
- Murthy PS, Ramalakshmi K, Srinivas P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chem* 2009;114:1014-8.
- Bandeira JM, Barbosa FF, Barbosa LMP, Rodrigues ICS, Bacarin MA, Peters JA, *et al.* Essential oil composition of four *Plectranthus* species. *Rev Bras Plantas Med* 2011;13:157-64.
- Joshi RK, Badakar V, Kholkute SD. Carvacrol rich essential oils of *Coleus aromaticus*

- (Benth.) from Western Ghats region of North West Karnataka, India. *Adv Environ Biol* 2011;5:1307-10.
11. Pinheiro PF, Costa AV, Alves TdA, Galter IN, Pinheiro CA, Pereira AF, *et al.* Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *J Agric Food Chem* 2015;63:8981-90.
 12. Shubha J, Bhatt P. *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *J Ethnopharmacol* 2015;166:220-7.
 13. Korac R, Krajišnik D, Savić S, Pantelić I, Jovancić P, Cekić N, *et al.* A new class of emulsion systems - Fast inverted o/w emulsions: Formulation approach, physical stability and colloidal structure. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2014;461:267-78.
 14. Traynor MP, Burke R, Frias JM, Gaston E, Barry-Ryan C. Formation and stability of an oil in water emulsion containing lecithin, xanthan gum and sunflower oil. *Int Food Res J* 2013;20:2173-81.
 15. Dora CL, Costa Silva LF, Mazzarino L, Siqueira JM, Fernandes D, Pacheco LK, *et al.* Oral Delivery of a High Quercetin Payload Nanosized Emulsion: *In Vitro* and *In Vivo* Activity Against B16-F10 Melanoma. *J Nanosci Nanotechnol* 2016;16:1275-81.
 16. Otto A, du Plessis J. The Effects of Emulsifiers and Emulsion Formulation Types on Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer Berlin Heidelberg 2015;223-41.
 17. Monteiro OS, Souza AG, Soledade LB, Queiroz N, Souza AL, Moudhrek Filho V, *et al.* Chemical evaluation and thermal analysis of the essential oil from the fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* Lindl. *J Therm Anal Calorim* 2011;106:2:595-600.
 18. Van den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatog A* 1963;11: 463-71.
 19. Ferreira MRA, Santiago RR, de Souza TP, Egito EST, Oliveira EE, Soares LAL. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. *AAPS PharmSci* 2010; 11:1383-90.
 20. Friberg SE, Corkery RW, Blute IA. Phase inversion temperature (PIT) emulsification process. *J Chem Eng Data* 2011;56:4282-90.
 21. Xavier-Junior FH, Silva KGH, Farias IEG, Morais ARV, Alencar EN, Araújo IB, *et al.* Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. *J Drug Deliv Sci Tec* 2012;22:4:367-72.
 22. Streck L, Araújo MM, Souza I, Fernandes-Pedrosa MF, Egito EST, Oliveira AG, *et al.* Surfactant-cosurfactant interactions and process parameters involved in the formulation of stable and small droplet-sized benzimidazole-loaded soybean O/W emulsions. *J Mol Liq* 2014;196:178-86.
 23. Amaral DMF, Bhargava K. Essential oil nanoemulsions and food applications. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J* 2015;1:84-7.
 24. Hassan A. Effective surfactants blend concentration determination for o/w emulsion stabilization by two nonionic surfactants by simple linear regression. *Indian J Pharm Sci* 2015;77:461.
 25. Kaviani D, Koonani M, Saghi M, Bigtan MH. Investigation of the effect of different parameters on the phase inversion temperature O/W nanoemulsions. *Nanomed J* 2016;3:65-8.
 26. Esquena J, Sankar GSR, Solans C. Highly concentrated W/O emulsions prepared by the PIT method as templates for solid foams. *Langmuir* 2003;19:2983-8.
 27. Pianovski AR, Vilela AFG, Silva AAS, Lima CG, Silva KK, Carvalho VFM, *et al.* Use of pequi oil (*Caryocar brasiliense*) in cosmetics emulsions: development and evaluate of physical stability. *Rev Bras Cienc Farm* 2008;44:249-59.
 28. Frange RCC, Garcia MTJ. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2010;30:263-71.
 29. Leal LB, Sousa GD, Seixas KB, Souza PHN, Santana DP. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. *Braz J Pharm Sci* 2013;49:167-73.
 30. Fernandes CP, Mascarenhas MP, Zibetti FM, Lima BG, Oliveira RPRF, Rocha L, *et al.* HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Rev Bras Farmacogn* 2013;23:108-14.
 31. Haddouchi F, Chaouche TM, Zauouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem* 2013;141:253-8.
 32. Macedo JP, Fernandes LL, Formiga FR, Reis MF, Júnior TN, Soares LA, *et al.* Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS Pharm Sci* 2006;7:E146-E52.
 33. Almeida PP, Mezzomo N, Ferreira SRS. Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: evaluation of process parameters and extract composition. *Food Bioprocess Tech* 2012;5: 548-59.
 34. Fornari T, Ruiz-Rodriguez A, Vicente G, Vázquez E, García-Risco MR, Reglero G, *et al.* Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. *J Supercrit Fluids* 2012;64:1-8.
 35. Galvão Rodrigues FF, Costa JGM, Rodrigues FFG, Campos AR. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; [Article ID 724161] 2013.
 36. Aguiar JJS, Sousa CPB, Araruna MKA, Silva MKN, Portelo AC, Lopes JC, *et al.* Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *Eur J Integr Med* 2015;7:151-6.
 37. Fernández de Simón Bg, Muñio I, Cadahia E. Characterization of volatile constituents in commercial oak wood chips. *J Agr Food Chem* 2010;58:9587-96.
 38. Azmir J, Zaidul I, Rahman M, Sharif K, Mohamed A, Sahena F. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J Food Eng* 2013;117:426-36.
 39. Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J. *Plectranthus*: A plant for the future. *S Afr J Bot* 2011;77:947-59.
 40. Olle M, Bender I, Koppe R. The content of oils in *umbelliferous* crops and its formation. *Agron Res* 2010;8: 687-96.
 41. El-hawary SS, El-sofany RH, Abdel-Monem AR, Ashour RS, Sleem AA. Seasonal variation in the composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil and its biological activities. *Am J Essent Oils Nat Prod* 2013;1:11-8.
 42. Noudogbessi J, Alitonou G, Djénontin T, Avlessi F, Figueredo G, Chalard P, *et al.* Chemical Compositions and Physico-chemical Properties of Three Varieties Essential oils of *Cymbopogon giganteus* Growing to the Spontaneous State in Benin. *Orient J Chem* 2013;29:59-67.
 43. Senthilkumar A, Venkatesalu V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitol Res* 2010;107:1275-8.
 44. Chen YS, Yu H-M, Shie J-J, Cheng T-JR, Wu C-Y, Fang J-M, *et al.* Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem* 2014;22:1766-72.
 45. Carneiro FB, Júnior I D, Lopes PQ, Macêdo RO. Variation in the amount of β -caryophyllene in essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Lamiaceae* under different conditions of cultivation. *Rev Bras Farmacog* 2010;20:600-6.
 46. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-75.
 47. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flav Fragr J* 2008;23:213-26.
 48. Otto A, Du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmetic Sci* 2009;31:1-19.
 49. Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Silva CB, Pohlmann AR, *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quim Nova* 2011;34:968-72.
 50. Hunter TN, Pugh RJ, Franks GV, Jameson GJ. The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 2008;137:57-81.
 51. Griffin WC. Classification of surface-active agents by "HLB". *J Soc Cosmet Chem* 1949;1:311-26.
 52. Xiang Z, Runge T. Emulsifying properties of succinylated arabinoxylan-protein gum produced from corn ethanol residuals. *Food Hydrocoll* 2016;52:423-30.
 53. Guerra-Rosas MI, Morales-Castro J, Ochoa-Martínez LA, Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocoll* 2016;52: 438-46.
 54. Varka EM, Ampatzidis C, Kostoglou M, Karapantsios T, Dutschik V. On the use of electrical conductance measurements for the stability of oil-in-water Pickering emulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2010;365:181-88.
 55. Hosseini A, Jafari SM, Mirzaei H, Asghari A, Akhavan S. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. *Carbohydr Polym* 2015;126:1-8.
 56. Ghosh S, Pradhan M, Patel T, Haj-shafiei S, Rousseau D. Long-term stability of crystal-stabilized water-in-oil emulsions. *J Colloid Interface Sci* 2015;460: 247-57.

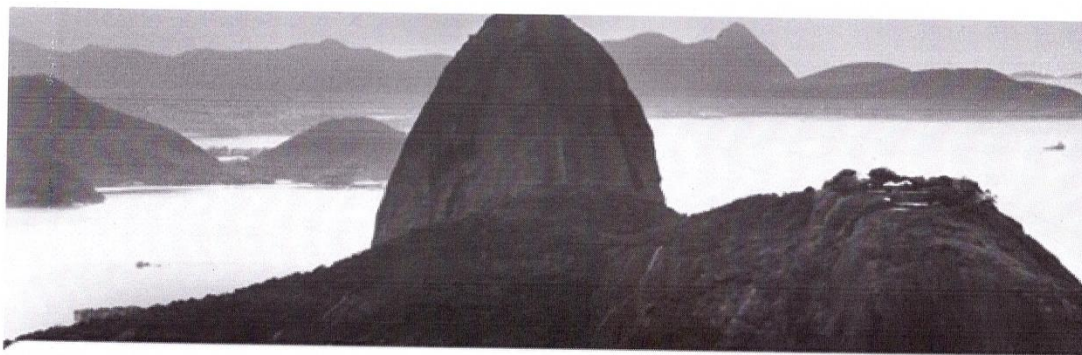
57. Chen N, Zhao M, Sun W, Ren J, Cui C. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate. *Food Res Int* 2013;52:26-32.
58. Masmoudi H, Le Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm* 2005;289:117-31.
59. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, *et al.* Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. *J Nanobiotechnology* 2011;9:1-9.
60. Abdullah GZ, Abdulkarim MF, Salman IM, Ameer OZ, Chitneni M, Mahdi ES. *et al.* Stability studies of nano-scaled emulsions containing ibuprofen for topical delivery. *Int J Drug Dev* 2011;3:74-82.
61. Mahmood T, Akhtar N. Stability of a cosmetic multiple emulsion loaded with green tea extract. *Scientific World J* 2013;[Article ID 153695], 2013:
62. Franzol A, Rezende MC. Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. *Polimeros* 2015;25:1-9.
63. Cefali LC, Souza-Moreira TM, Corrêa MA, Salgado HRN, Isaac VLB. Development and evaluation of an emulsion containing lycopene for combating acceleration of skin aging. *Braz J Pharm Sci* 2015;51:579-90.
64. Ruzsiková A, Součková L, Suk P, Opatřilová R, Kejdušová M, Šrámek V, *et al.* Quantitative analysis of drug losses administered via nasogastric tube-*in vitro* study. *Int J Pharm* 2015;478:368-71.
65. Viana C, Bohrer D, Carvalho LM, Nascimento PC, Rosa MB. Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods. *Trends Anal Chem TrAC* 2014;53:49-59.

ANEXOS

ANEXO A - Apresentação do trabalho científico no 10º Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, CIFARP 2015, Ribeirão Preto, intitulado: Evaluation of Antifungal and Bacterial Activity in vitro and ex vivo of *Plectranthus amboinicus* Emulsions.



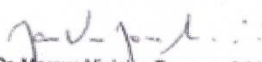
ANEXO B- Apresentação do trabalho científico no 8º RIOPHARMA, Congresso de Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro intitulado: *EVALUATE THE ACTIVITY ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL IN VITRO THE EMULSIONS CONTAINING ESSENTIAL OIL SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI*.



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho científico **EVALUATE THE ACTIVITY ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL IN VITRO THE EMULSIONS CONTAINING ESSENTIAL OIL SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI**, autores **PABLO QUEIROZ LOPES (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE); FABIOLA BERNARDO CARNEIRO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE); RAPHAEL ALMEIDA LIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB); SÓCRATES GOLZIO DOS SANTOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB); ELQUIO ELEMEN OLIVEIRA (UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA-UEPB); LUIS ALBERTO DE LIRA SOARES (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB)**, foi apresentado no XVIII Congresso da Federação Farmacêutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas, com carga horária de 28 horas, que abordou como tema "A prescrição farmacêutica e os novos paradigmas da profissão" e teve como eixo central "Atuação clínica do farmacêutico", de 15 a 17 de outubro de 2015, no Centro de Convenções SulAmérica, no Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2015.


Dr. Marcus Vinicius Romano Athila
Presidente do CRF-RJ


Dr. Carlos Santarem
Presidente do Congresso


Dr. Robson Rohey Bernardo
Presidente da Comissão Científica



ANEXO C- Apresentação do trabalho científico no 8º RIOPHARMA, Congresso de Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, intitulado: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF EMUSION PHISICAL STABILITY CONTAINING ESSENTIA OIL FROM *EUCALIPTOS GLOBULUS* LABILL.



ANEXO D- Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba-CEP/CCS/UFPB.




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS/UFPB, aprovou por unanimidade na 8ª Reunião Ordinária, realizada no dia 24/09/2015, o parecer favorável do Relator desse egrégio Comitê, autorizando o Pesquisador Pablo Queiroz Lopes, a publicar a Pesquisa intitulada: **“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE PLECTRANTHUS AMBOINICUS LOUR, SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI E EUCALYPTUS GLOBUTUS LABILL, SOBRE O FUNGO CANDIDA ALBICANS E TRICHOPHITON RUBRUM COMUM NAS INFECÇÕES DE UNHAS”**. Protocolo 0549/14. CAAE: 36919814.4.0000.5188

João Pessoa, 24 de setembro de 2015.


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

ANEXO E- Declaração de identificação e caracterização anatômica dos materiais vegetais cultivados na Empresa Laboratório Água Rabelo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE SISTEMÁTICA E ECOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins, que o material coletado na área de cultivo da Empresa Laboratório Água Rabelo, situada na Cidade de Cabedelo, Paraíba, foi identificado e caracterizado anatomicamente por especialistas do Departamento de Sistemática e Ecologia do CCEN/UFPB. Em anexo, documentos referentes à identificação e a caracterização anatômica dos materiais coletados.

João Pessoa, 30 de agosto de 2013.

Dra. Rita Baltazar de Lima

Ms. Maria do Ceo Rodrigues Pessoa

Dr. Rivete Silva de Lima



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE SISTEMÁTICA E ECOLOGIA

Identificação Botânica

As amostras de material botânico, ora referidas, foram identificadas como ***Schinus terebinthifolius* Raddi** (Aroeira da Praia) e ***Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.** (Hortelã da Folha Grossa) e registradas no acervo do Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) sob números de tombo **JPB 54051, 54052, 54053** (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e **JPB 54054, 54055** (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.).

ANEXO F- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Avaliação da Toxicidade Aguda da Emulsão de *Eucalyptus globulus* Labill em roedores.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 11 de setembro de 2014

CEUA Nº 1105/14

Ilmo(a). **Profª Drª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**
Departamento **Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB**

Orientando(a): **Profª Drª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, (Iniciação Científica)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **11/09/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA EMULSÃO DE Eucalyptus globulus Labill EM ROEDORES.**

Com previsão de empregar **12 Ratas WISTAR, 12 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/08/2014 a 01/08/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIOTEC/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBIOTEC
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br

ANEXO G- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Investigaçã da Toxicidade Aguda da Emulsão de *Schinus terebenthifolius* Raddi em ratos wistar por vial oral.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 11 de setembro de 2014

CEUA Nº 1205/14

Ilmo(a). Profª Drª Caliandra Maria Bezerra Luna Lima

Departamento Departamento de Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(a): Profª Drª Caliandra Maria Bezerra Luna Lima, (Iniciação Científica)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **11/09/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA EMULSÃO DE *Schinus terebenthifolius* Raddi EM RATOS WISTAR POR VIA ORAL.**

Com previsão de empregar **12 Ratas WISTAR, 12 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/08/2014 a 01/08/2015**

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIOTEC/UFPB**

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBIOTEC
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br**

ANEXO H- Declaração do Comitê no Uso de animais da Universidade Federal da Paraíba de execução do projeto Avaliação da Toxicidade Aguda da Emulsão de *Plectranthus amboinicus* Lour em roedores



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 11 de setembro de 2014
CEUA Nº 1005/14

Ilmo(a). **Profª Drª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**
Departamento **Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB**

Orientando(a): **Profª Drª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, (Iniciação Científica)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **11/09/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA EMULSÃO DE *Plectranthus amboinicus* Lour EM ROEDORES.**

Com previsão de empregar **12 Ratas WISTAR, 12 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/08/2014 a 01/08/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br