



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E SISTEMAS PARA ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia brejoensis* MAZINE (MYRTACEAE)**

NATALY AMORIM DE SANTANA

RECIFE
2016

NATALY AMORIM DE SANTANA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E SISTEMAS PARA ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia brejoensis* MAZINE (MYRTACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr^a Giovanna Machado
Co-orientador: Dr^a Janaina Viana de Melo

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santana, Nataly Amorim de

Atividade antifúngica e sistemas para encapsulação do óleo essencial de folhas de *Eugenia brejoensis* mazine (Myrtaceae)/ Nataly Amorim de Santana– Recife: O Autor, 2016.

92 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Giovanna Machado

Coorientadora: Janaina Viana de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

- 1. Plantas medicinais 2. Óleos vegetais 3. Nanotecnologia I. Machado, Giovanna (orientadora) II. Melo, Janaina Viana de (coorientadora) III. Título**

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-170

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTANA, NATALY AMORIM

Título: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E SISTEMAS PARA ENCAPSULAÇÃO DO
ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/02/2016

Banca Examinadora

Dra. Giovanna Machado (Orientadora) – CETENE

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto – UFPE

Dra. Alessandra Batista de Mattos - CETENE

Dr. Alexandre Gomes da Silva – INSA

Profa. Dra. Elaine Virgínia Martins de Souza - UFAL

AGRADECIMENTOS

À Giovanna Machado pela oportunidade, confiança e incentivo.

À Janaina Melo, pelo apoio.

Aos professores Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Márcia Vanusa da Silva e Maria Tereza dos Santos Correia pela colaboração e pelas correções e sugestões dadas no Exame de Qualificação.

Aos professores Daniela Maria do Amaral Ferraz e Navarro e Juliano Elvis de Oliveira pela colaboração e atenção.

À Me. Rayane Santos pela contribuição nas análises de *headspace*.

Ao Dr. Alexandre Gomes pela atenção e colaboração.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e em especial aos colegas de trabalho, Adriana, Aldenise, Gian e Isaac, pelo apoio nas análises.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 As plantas medicinais.....	16
3.2 Os metabólitos secundários	17
3.3 Os óleos essenciais	18
3.3.1 Importância econômica.....	19
3.3.2 Processos de extração	21
3.3.3 Composição química	23
3.3.4 Propriedades antimicrobianas	25
3.3.5 Mecanismo de ação.....	26
3.3.6 Encapsulamento	27
3.4 Impacto mundial das infecções por dermatófitos e leveduras	31
3.5 <i>Eugenia brejoensis</i>	34
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 1	51
CAPÍTULO 2	64
CAPÍTULO 3	82
5 CONCLUSÕES	92

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 FATORES CAPAZES DE INFLUENCIAR A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS.....	17
FIGURA 2 MAIORES EXPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL DO MUNDO NO ANO DE 2014.....	20
FIGURA 3 MAIORES IMPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL PROVENIENTE DO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2014.....	20
FIGURA 4 MAIORES IMPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL NO ANO DE 2014.....	21
FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR HIDRODESTILAÇÃO.....	23
FIGURA 6 MICRO E NANOSSISTEMAS UTILIZADOS PARA ENCAPSULAR ÓLEO ESSENCIAL.....	27
FIGURA 7 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA.....	28
FIGURA 8 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA α , β E γ -CICLODEXTRINAS MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, AS DIMENSÕES DA CAVIDADE INTERNA DE 0,57, 0,78 E 0,95 NM.....	29
FIGURA 9 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS POR MEIO DO DESLOCAMENTO DE MOLÉCULAS DE ÁGUA E SUBSTITUIÇÃO PELA MOLÉCULA CONVIDADA HIDROFÓBICA.....	30

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i> (OEB), β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD) EM ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (50 ML/MIN) E TAXA DE AQUECIMENTO DE 10 °C/MIN.....	74
FIGURA 2 CURVAS DE TERMOGRAVIMETRIA (TG) DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i> (OEB), β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD) EM ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (50 mL/min) E TAXA DE AQUECIMENTO DE 10 °C/min.....	75
FIGURA 3 PADRÃO DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD)	76

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (A), ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (B) E POTENCIAL ZETA (C) EM RELAÇÃO AO TEMPO DE	
--	--

HOMOGENEIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i>	87
---	----

FIGURA 2 VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (A), ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (B) E POTENCIAL ZETA (C) EM RELAÇÃO A VELOCIDADE DE HOMOGENEIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i>	88
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS DE <i>E. brejoensis</i>	71
TABELA 2. MÉDIA DAS ÁREAS REAIS DOS PICOS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i> (β -CARIOFILENO, BICICLOGERMACRENO, δ -CADINENO E ESPATULENOL) QUANDO COMPLEXADOS NA β -CICLODEXTRINA.....	77
TABELA 3. MÉDIA DAS ÁREAS REAIS DOS PICOS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i> (β -CARIOFILENO, BICICLOGERMACRENO, δ -CADINENO E ESPATULENOL) NO ÓLEO LIVRE.....	78

CAPÍTULO 3

TABELA 1. POTENCIAL ZETA, DIÂMETRO DE GOTA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (Pdl) DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. brejoensis</i> OBTIDAS POR HOMOGENEIZAÇÃO A 12000 rpm DURANTE 4 MINUTOS.....	89
--	----

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

QUADRO 1 COMPONENTES MAJORITÁRIOS (>10%) DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>Eugenia</i>	24
---	----

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS EQUINOCADINAS E ANFOTERICINA B EM RELAÇÃO AO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia brejoensis</i> (OEB) CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>CANDIDA</i> E <i>CRYPTOCOCCUS</i> OBTIDOS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA E NEUROCRIPTOCOCCOSE, RESPECTIVAMENTE, EM HOSPITAL PÚBLICO DO RECIFE, BRASIL, ENTRE JULHO DE 2012 E JUNHO DE 2013, E CONTRA DERMATÓFITOS OBTIDOS DE PACIENTES COM DERMATOFITOSE CUTÂNEA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS, UFPE, BRASIL, ENTRE ABRIL E JUNHO DE 2013.....	58
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Dispersões Água em Óleo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ALICEWeb	Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior
ATG	Análises Termogravimétricas
ATP	Adenosina Trifosfato
BCD	β -ciclodextrina
CHCA	Ácido A-4-Ciano-Hidroxicinâmico
CIM	Concentrações Inibitórias Mínimas
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
Erg11p	Enzima Lanosterol 14 α -Desmetilase
GC-FID	Cromatografia Gasosa Acoplada à Detector de Ionização de
Chama	
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
HE-GC	Análise de <i>Headspace</i> Estático Acoplado à Cromatografia
Gasosa	
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass
Spectrometer	
MF	Mistura Física
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
O/A	Dispersões de Óleo em Água
OEB	Óleo Essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>
OEB CD	Complexo de Inclusão Óleo Essencial de <i>E. brejoensis</i> e BCD
OMS	Organização Mundial da Saúde
PdI	Índice de Polidispersidade

PEC	Parâmetro de Empacotamento Crítico
Reflora	Programa "Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira"
TFA	Ácido Trifluoroacético
TG	Termogravimetria
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	Coleção de Cultura URM /UFPE/Brasil
WDCM	Centro Mundial de Dados sobre Micro-organismos
WFCC	Federação Mundial de Coleções de Cultura
YPD	Extrato de Levedura, Peptona, Glicose e Ágar

RESUMO

Os óleos essenciais extraídos de plantas possuem diversas propriedades biológicas, e sendo assim, podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos. Entretanto, os mesmos apresentam alguns fatores que limitam a sua utilização no desenvolvimento de produtos, tais como, alta volatilidade, instabilidade e baixa solubilidade. Assim, a encapsulação de óleos essenciais tem sido utilizada como uma estratégia eficiente que permite aumentar a estabilidade física e bioatividade, como também diminuir a volatilidade dos mesmos. No presente trabalho foi avaliado, o óleo essencial de folhas de *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae), uma espécie arbustiva encontrada em alguns estados do Nordeste e do Sudeste brasileiro e popularmente utilizada no tratamento de diarreia, febre e reumatismo. A composição química do óleo essencial de *E. brejoensis* (OEB) foi definida por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) e a sua atividade antifúngica frente à isolados clínicos de dermatófitos e leveduras foi definida de acordo com protocolos do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI). Em seguida, foram preparados e caracterizados sistemas de encapsulação baseados em nanoemulsões e complexação molecular com β -ciclodextrina (BCD) para a veiculação do óleo essencial. A investigação da complexação molecular do óleo essencial de *E. brejoensis* e a β -ciclodextrina foi feita por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e difração de raios X (DRX). O estudo da liberação de compostos voláteis do óleo essencial de *E. brejoensis* livre e encapsulado na β -ciclodextrina foi realizado por análise de *headspace* estático acoplado a Cromatografia Gasosa (HE-GC). Os resultados mostraram que o óleo essencial de *E. brejoensis* é um antifúngico de amplo espectro, pois mostrou atividade contra todos os fungos testados com Concentração Inibitória Mínima entre 0,39 – 12,5 $\mu\text{L/mL}$. Ademais, a encapsulação do óleo essencial foi possível tanto pelo sistema de nanoemulsão como pelo sistema de inclusão molecular com β -ciclodextrina. A nanoemulsão O/A desenvolvida apresentou diâmetro médio de partícula de $143,1 \pm 1,1$ nm, Pdl $0,219 \pm 0,004$ e potencial zeta de $-19,7 \pm 0,1$ mV. O complexo de inclusão entre o óleo essencial de *E. brejoensis* e β -ciclodextrina foi obtido na proporção molar de 1:1 e mostrou ser capaz de proteger o óleo essencial contra a degradação térmica e volatilidade. A análise de *headspace* estático mostrou um percentual de retenção do óleo essencial de *E. brejoensis* na β -ciclodextrina de 86,87% e que a liberação dos componentes voláteis ocorre de forma gradual.

Palavras-chave: *Eugenia brejoensis*. Atividade antifúngica. β -ciclodextrina. Nanoemulsões.

ABSTRACT

Plant essential oils have several biological properties and can be used for the development of pharmaceuticals and cosmetics. However, they have some factors that limit their use in the development of products such as high volatility, instability and poor solubility. Thus, the encapsulation of essential oils has been used as an efficient strategy that can increase physical stability and bioactivity, as well as reducing the volatility thereof. In this work was evaluated, *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae) essential oil, a shrubby species found in some states of the Northeast and Southeast Brazil and popularly used to treat diarrhea, fever and rheumatism. The essential oil chemical composition of *E. brejoensis* (OEB) was defined by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) and its antifungal activity against the clinical isolates of dermatophytes and yeasts was defined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols. Then, were prepared and characterized encapsulation systems based on nanoemulsions and molecular complexation with β -cyclodextrin (BCD). The investigation of molecular complexing was made by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TGA) and X-ray diffraction (XRD). The release study of the of volatiles compounds from the essential oil of *E. brejoensis* free and encapsulated in β -cyclodextrin was performed by Static Headspace - Gas Chromatography (GC-HE) analysis. The results showed that the essential oil of *E. brejoensis* is a broad-spectrum antifungal and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) range between 0.39 to 12.5 $\mu\text{L/mL}$. Moreover, the encapsulation of essential oil was possible both the nanoemulsion system as the β -cyclodextrin molecular system. The nanoemulsion O/W showed an average particle size diameter of 143.1 ± 1.1 nm, Pdl 0.219 ± 0.004 and zeta potential of -19.7 ± 0.1 mV. The *E. brejoensis* essential oil and β -cyclodextrin molecular complex was obtained in the molar ratio 1: 1 and was found to be capable of protecting the essential oil against thermal degradation and volatility. The static headspace analysis showed an retention percentage by β -cyclodextrin of 86.87%, and the release of essential oil volatile components occurs gradually.

Keywords: *Eugenia brejoensis*; Antifungal activity; β -cyclodextrin; nanoemulsion.

1. INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas e os seus óleos essenciais são aplicados na medicina tradicional desde a Antiguidade devido, sobretudo, aos seus efeitos antimicrobianos. Estima-se que existam de 220.000 a 450.000 espécies de plantas no mundo (SCOTLAND; WORTLEY, 2003). Deste total, apenas uma minoria destas espécies foi submetida a uma avaliação científica das suas propriedades biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2012; SAVOIA, 2012).

O Brasil é considerado o país que contém a mais rica biodiversidade de plantas do mundo. Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil do Programa "Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira - REFLORA", atualmente há mais de 46.000 espécies de plantas no Brasil. Devido à vasta biodiversidade, o Brasil possui um alto potencial para o descobrimento de plantas com atividade antimicrobiana. Assim, compostos bioativos únicos que tenham fins medicinais podem ser encontrados na flora brasileira.

A *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae) é uma espécie de arbusto encontrado nas Regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (GIARETTA; PEIXOTO, 2014; MAZINE; SOUZA, 2008). Na medicina popular, a *E. brejoensis* é utilizada para o tratamento de diarreia, febre e reumatismo. Laboratorialmente, extratos de *E. brejoensis* foram capazes de inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AZEVEDO et al., 2012) e o seu óleo essencial apresentou atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (DA SILVA et al., 2015). Entretanto, a propriedade antifúngica do seu óleo essencial ainda não foi reportada.

A pesquisa de plantas medicinais e suas propriedades farmacológicas são de fundamental importância para a validação do seu uso na medicina convencional e desenvolvimento de bioprodutos de interesse industrial (BARRETO et al., 2014). No período compreendido entre os anos de 1981 a 2006, 21% das novas drogas antifúngicas aprovadas foram derivadas ou simuladas a partir de produtos naturais (NEWMAN, 2008).

Quando se deseja encontrar propriedades antimicrobianas em plantas aromáticas, os óleos essenciais são o principal alvo. Os mesmos são constituídos de uma mistura complexa de componentes voláteis formados principalmente de terpenos e terpenóides (ASBAHANI et al., 2015; NAKATSU et al., 2000). Alguns estudos já demonstraram que o óleo essencial puro é muito mais efetivo contra micro-organismos

do que os seus componentes isolados ou mesmo uma mistura dos seus componentes majoritários (MAHMOUDVAND et al., 2014; PINTO et al., 2014; WANG et al., 2015). Sendo assim, embora o componente majoritário exerça a atividade mais forte, sugere-se que esses componentes presentes em menores quantidades ajam sinergicamente e promovam o efeito antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008).

Vários estudos comprovam a sensibilidade de alguns fungos patogênicos humanos aos óleos essenciais de diversas espécies de plantas, como também, mostram que os mesmos podem ser utilizados para melhorar a atividade antifúngica de drogas utilizadas comercialmente, tais como, fluconazol e metronidazol (CETIN et al., 2009; SIMBAR et al., 2008; TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013; ZABKA; PAVELA; PROKINOVA, 2014; ZORE et al., 2011; ZUZARTE et al., 2012). Estes achados são de muita relevância, dado o grande aumento de muitas espécies resistentes às drogas convencionais.

Sendo assim, é crucial o descobrimento de novos compostos que utilizem mecanismos diferentes dos antimicóticos convencionais para o combate aos fungos. Já que são formados por um grande número de constituintes lipofílicos, os óleos essenciais não possuem um alvo exclusivo e o seu mecanismo de ação dá-se pela permeabilização das membranas celulares e indução de um colapso geral nas mesmas (CARSON; MEE; RILEY, 2002; DI PASQUA et al., 2006, 2007; TURINA et al., 2006).

A aplicabilidade tecnológica dos óleos essenciais é limitada pela sua instabilidade física, alta volatilidade e baixa solubilidade. Neste sentido, sugere-se a encapsulação do mesmo em nanocarreadores. Além de proteger o óleo essencial contra as condições ambientais e volatilidade, os nanocarreadores podem atuar sinergicamente com o óleo essencial e potencializar o efeito biológico (BILIA et al., 2014; CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013; GUERRA-ROSAS et al., 2016; MOGHIMI et al., 2016; RĂILEANU et al., 2013).

Diversos tipos de estratégias podem ser utilizadas para a encapsulação de óleo essenciais. Entre estas estratégias estão a formação de nanoemulsões entre o óleo essencial e surfactantes, como também, a complexação molecular com β -ciclodextrinas (BILIA et al., 2014; DIMA; DIMA, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica frente a isolados clínicos de dermatófitos e leveduras e desenvolver sistemas de encapsulamento do óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia brejoensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os constituintes do óleo essencial extraídos de folhas de *E. brejoensis* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GC-FID);
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. brejoensis* frente a isolados clínicos de dermatófitos e leveduras de acordo com protocolos do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI);
- Desenvolver um sistema de inclusão molecular do óleo essencial de *E. brejoensis* com β -ciclodextrina;
- Investigar a complexação do óleo essencial de *E. brejoensis* em β -ciclodextrina por meio de análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), termogravimetria (TG) e difração de raios X (DRX);
- Estudar a liberação do biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e espatulenol no óleo essencial de *E. brejoensis* por análises de *headspace* estático acoplado a cromatografia gasosa (HE-GC);
- Desenvolver uma nanoemulsão O/A para veiculação do óleo essencial de *E. brejoensis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS PLANTAS MEDICINAIS

Existem registros arqueológicos que comprovam a utilização de plantas medicinais para o tratamento e cura de doenças na população humana desde a pré-história (GURIB-FAKIM, 2006). Civilizações muito antigas, como por exemplo as civilizações africana e indiana, tinham conhecimento da localização e dos efeitos terapêuticos das plantas (GURIB-FAKIM, 2006; PHILLIPSON, 2001). Assim, o emprego das plantas medicinais pela população humana se estende até os dias atuais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população global, principalmente em países em desenvolvimento, façam uso de cerca de 20.000 espécies de plantas medicinais para cuidados primários com a saúde (OMS, 2005).

Muitos produtos farmacêuticos disponíveis comercialmente são provenientes de biocompostos presentes em plantas utilizadas na medicina tradicional. Estes biocompostos ou são utilizados diretamente como agentes terapêuticos, ou servem de base para a elaboração de compostos semi-sintéticos ou são modelos para a síntese de novas substâncias utilizadas na medicina convencional (GURIB-FAKIM, 2006). A droga artemisina (derivada de *Artemisia annua*), utilizada para o tratamento da malária, a droga anticâncer taxol (derivada de *Taxus brevifolia*) e o analgésico morfina (derivado de *Papaver somniferum*) são exemplos bastantes conhecidos de drogas baseadas em plantas medicinais.

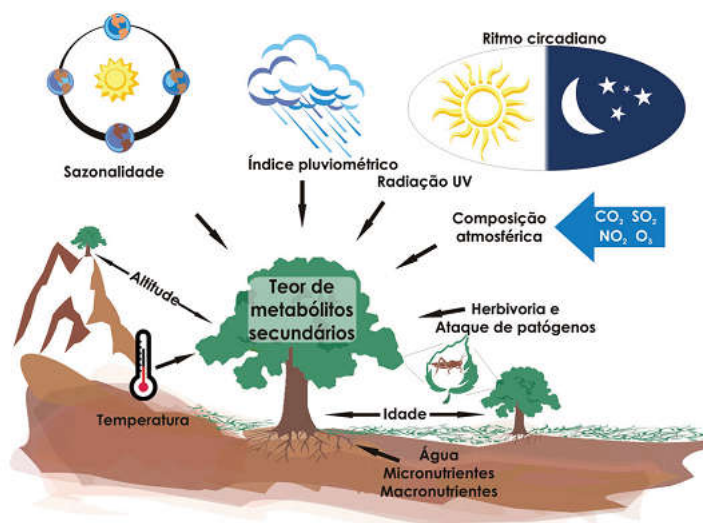
A maioria dos compostos encontrados em plantas que possuem alguma atividade biológica e são, portanto, úteis para fins medicinais são denominados de metabólitos secundários. Estes podem ser isolados e caracterizados a partir do processamento de extrato, goma, ácidos graxos ou óleos essenciais obtidos de diferentes partes das plantas medicinais (OMS, 2000).

3.2 OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são sinalizadores químicos que atuam na interação da planta com o meio ambiente e são produzidos em resposta a agressões sofridas pelas plantas por micróbios patogênicos e herbívoros (KLIEBENSTEIN, 2012). Os metabólitos secundários, são assim denominados, pois, não participam diretamente de processos essenciais nas plantas, como o crescimento e desenvolvimento. Sendo assim, os mesmos não apresentam um perfil de distribuição global em todas as plantas, mas são restritos a algumas espécies (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

O percentual do metabólito secundário produzido pelas diferentes espécies de plantas é influenciado por fatores genéticos, ontogenéticos, morfogenéticos e ambientais (VERMA; SHUKLA, 2015). Entre os fatores ambientais que são capazes de regular a produção dos metabólitos secundários estão temperatura, estresse hídrico, salinidade, sazonalidade, altitude, incidência de luz, deficiência de nutrientes e ataque de agentes biológicos (Figura 1) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

FIGURA 1. FATORES CAPAZES DE INFLUENCIAR A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS (FONTE: GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



A biossíntese dos metabólitos secundários produz uma variedade de compostos orgânicos que são classificados em três grandes grupos: terpenos, componentes fenólicos e componentes nitrogenados (VERMA; SHUKLA, 2015).

Os terpenos são os metabólitos secundários mais abundantes e são formados por unidades contendo cinco carbonos denominadas de isoprenos. Por meio da associação das unidades isoprênicas são formadas diferentes classes de terpenos, por exemplo, os monoterpenos (duas unidades C₅) e os sesquiterpenos (três unidades C₅) (VERMA; SHUKLA, 2015). A biossíntese dos terpenos ocorre a partir das vias do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato (PATERAKI; KANELIS, 2010). Na via do ácido mevalônico, três moléculas de acetil-CoA associam-se e formam o ácido mevalônico que em seguida, passa por modificações químicas até a formação do isopentenil difosfato. Este, também pode ser formado na via metileritritol fosfato a partir de intermediários da glicólise. O isopentenil difosfato e o seu isômero o difosfato de dimetilalilo são as unidades compostas por cinco carbonos que são a base para a formação dos terpenos (BASER; BUCHBAUER, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os terpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de plantas (BASER; BUCHBAUER, 2010).

As moléculas pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos são bastante heterogêneas e, nas plantas, estes compostos são biossintetizados, sobretudo, pela via do ácido chiquímico a partir de precursores derivados do metabolismo da glicose (TAIZ; ZEIGER, 2006). Devido a sua diversidade, os compostos fenólicos podem ser divididos em diferentes grupos, tais como: ligninas, flavonoides e taninos. A constituição básica dos compostos fenólicos é o anel aromático associados a um ou mais grupos hidroxila (ACHAKZAI et al., 2009).

Por fim, os compostos nitrogenados são componentes orgânicos que contêm nitrogênio em sua estrutura e que são sintetizados, em sua maioria, a partir dos aminoácidos ornitina, lisina, tirosina e triptofano. Os alcaloides são os principais representantes desta classe de metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2006).

3.3 OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de plantas e que são formados por misturas complexas de componentes voláteis de baixo peso molecular (< 500 Da), solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis com a água (ASBAHANI et al., 2015; NAKATSU et al., 2000).

Estes óleos possuem aplicações diversas nas indústrias cosmética e alimentícia, na agricultura, em produtos sanitários e também como remédios naturais.

Atualmente, são conhecidos mais de 3.000 tipos de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas, mas somente 300 deles são de interesse comercial (BAKKALI et al., 2008; BASER; BUCHBAUER, 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

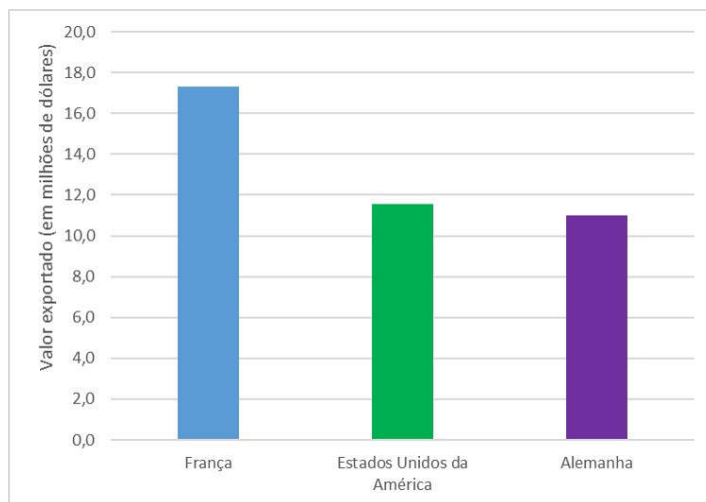
A biossíntese dos óleos essenciais ocorre em diversas partes de plantas aromáticas (flores, folhas, frutas e sementes) como metabólitos secundários e o seu armazenamento é feito por células secretórias, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008; BASER; BUCHBAUER, 2010; FRANZ, 2010). Embora possam ser obtidos a partir de vários órgãos das diferentes espécies de plantas, os óleos essenciais são considerados substâncias raras, uma vez que, apenas 10% das espécies de plantas existentes no mundo o possuem e além disso, seu rendimento no processo de extração é geralmente muito baixo, cerca de 1%, variando de acordo com a espécie e o órgão da planta utilizado (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Cerca de 60 famílias de plantas possuem espécies produtoras de óleos essenciais. As famílias Apiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Rutaceae e Myrtaceae são grandes produtoras de óleos essenciais com aplicações medicinais e industriais (HAMMER; CARSON, 2011; VIGAN, 2010).

3.3.1 Importância econômica

Mais de 70.000 toneladas de óleo essencial é produzida por ano em todo o mundo e estes óleos são utilizados principalmente nas indústrias de cosmética e aromaterapia (BASER; BUCHBAUER, 2010). O mercado mundial de óleo essencial no ano de 2014 movimentou em torno de 230 milhões de dólares. Segundo o *International Trade Center*, os três maiores países exportadores de óleo essencial do mundo são França, Estados Unidos e Alemanha (Figura 2).

FIGURA 2. MAIORES EXPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL DO MUNDO NO ANO DE 2014 SEGUNDO O INTERNATIONAL TRADE CENTER (DATA DE ACESSO: 10/01/2016).



Nesta classificação, o Brasil se situa na vigésima quarta posição exportando óleo essencial primeiramente para Argentina, Estados Unidos e Chile (Figura 3). No que se refere a importação, Os Estados Unidos, seguido pela Alemanha, Reino Unido e França são os maiores importadores de óleo essencial (Figura 4).

FIGURA 3. MAIORES IMPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL PROVENIENTE DO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2014, SEGUNDO O INTERNATIONAL TRADE CENTER (DATA DE ACESSO: 10/01/2016).

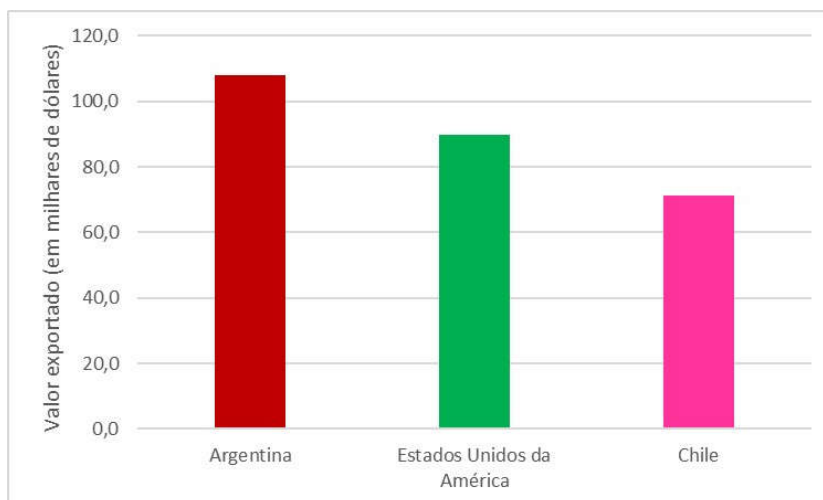
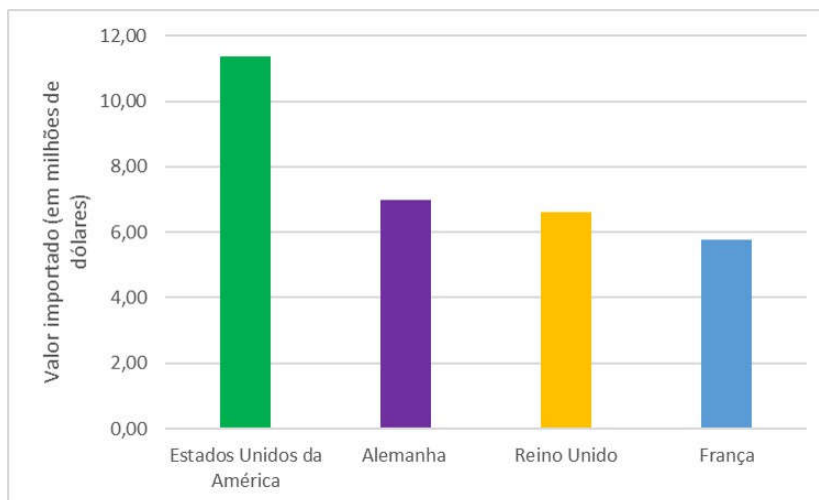


FIGURA 4. MAIORES IMPORTADORES DE ÓLEO ESSENCIAL NO ANO DE 2014 SEGUNDO O INTERNATIONAL TRADE CENTER (DATA DE ACESSO: 10/01/2016).



Os óleos essenciais de laranja (*C. sinensis*), milho (*Mentha arvensis*), hortelã (*Mentha* sp), eucalipto (*E. globulus*) citronela (*Cymbopogon* sp.), limão (*C. limon*), alho (*S. aromaticum*) e cânfora (*C. camphora*) são produzidos em grande escala e possuem um grande valor comercial que pode variar dependendo de alguns fatores, tais como, a fonte, a pureza e a composição do óleo (BASER; BUCHBAUER, 2010; HUSSAIN et al., 2008).

No Brasil, segundo o sistema ALICEWeb (Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior), de janeiro a novembro do ano de 2015 foram exportadas cerca de 23 toneladas de óleo essencial perfazendo o total de mais U\$136 milhões, sendo o óleo essencial de laranja o principal produto exportado. Além do óleo de laranja são exportados do Brasil os óleos de bergamota, laranja *petit grain*, limão, lima e outros cítricos, gerânio, jasmim, alfazema ou lavanda, hortelã-pimenta, menta japonesa, menta *spearmint*, outras mentas, vetiver, citronela, cedro, pau-santo e lemongrass.

3.3.2 Processos de extração

Para a extração de óleos essenciais obtidos de plantas podem ser utilizados os métodos convencionais ou os métodos avançados (ASBAHANI et al., 2015; DIMA;

DIMA, 2015). Os métodos convencionais são baseados na destilação em água, extração por solvente orgânico e prensagem a frio.

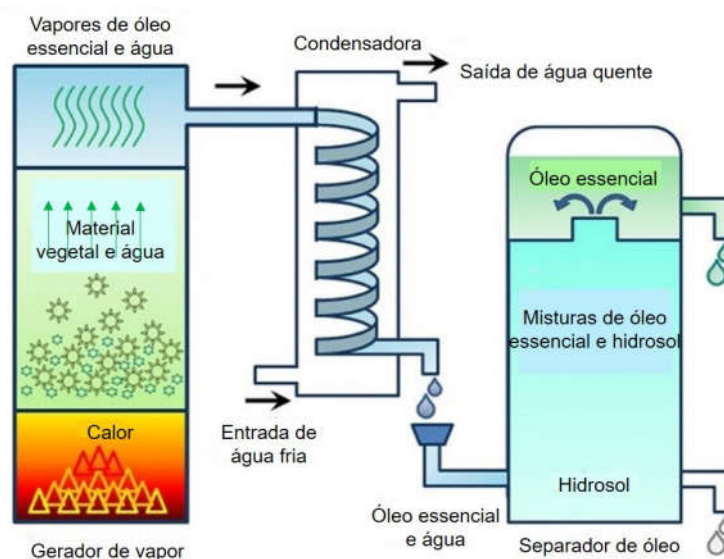
Existem diversas variações na metodologia de destilação e o que as diferencia é se o material vegetal está ou não em contato com a água. A hidrodestilação é o método mais simples e mais antigo, de fácil implementação e de baixo custo utilizado para a extração de óleos essenciais. A hidrodestilação utilizando o sistema de Clevenger é o método recomendado pela Farmacopeia Europeia para a determinação do rendimento do óleo essencial. Neste método, a parte da planta onde será extraído o óleo essencial é imersa diretamente na água e colocada para ferver (Figura 5). A água e o óleo essencial são misturados simultaneamente e a decantação da água permite a separação do óleo essencial (ASBAHANI et al., 2015; DIMA; DIMA, 2015).

Na extração por solvente, o material vegetal é macerado em solvente orgânico e o extrato é concentrado por meio da retirada do solvente em baixa pressão. A utilização deste método para a extração do óleo essencial impede a utilização do mesmo em alimentos ou aplicações farmacológicas, já que ocorre a contaminação do óleo essencial pelo material orgânico (ASBAHANI et al., 2015).

A prensagem a frio é o método tradicionalmente utilizado para extrair óleo essencial de frutas cítricas. Neste método, as glândulas que armazenam o óleo essencial são prensadas para a liberação do óleo essencial e o mesmo é depois separado por centrifugação (FERHAT; MEKLATI; CHEMAT, 2007).

Já a extração por métodos avançados foi desenvolvida para superar, sobretudo, o tempo gasto na extração convencional. Neste tipo de extração, são utilizados tipos de energias diferentes ou são utilizados modos para aumentar as características dos solventes. A extração com fluido supercrítico (MOURA et al., 2005), a extração com CO₂ subcrítico (ZIZOVIC et al., 2007), a extração assistida por ultrassom (ASSAMI et al., 2012) e a extração assistida por micro-ondas (FILLY et al., 2014; GAVAHIAN et al., 2015) são alguns exemplos destes métodos avançados de extração de óleo essencial.

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR HIDRODESTILAÇÃO (FONTE: ADAPTADO DE TONGNUANCHAN; BEJAKUL, 2014).



3.3.3 Composição química

Os óleos essenciais são compostos por mais de 100 diferentes componentes químicos, sendo alguns destes presentes em altas concentrações e outros presentes apenas em traços (BASER; BUCHBAUER, 2010). Além disso, também são observadas variações qualitativas e quantitativas na composição química como ocorre, por exemplo, com mudanças sazonais do clima e solo e técnicas de extração (ANGIONI et al., 2006; MASOTTI et al., 2003; PETRETTO et al., 2016). A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) são as metodologias mais utilizadas para a detecção e quantificação destes componentes no óleo essencial (CSERHÁTI, 2010).

Os vários componentes dos óleos essenciais possuem baixo peso molecular (< 500 Da) e são geralmente lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis com a água (NAKATSU et al., 2000). Os constituintes mais encontrados nos óleos essenciais são os terpenos e com menor frequência, os componentes aromáticos. Nas espécies de *Eugenia* há a predominância de sesquiterpenos cíclicos e monoterpenos (Quadro 1).

Os principais terpenos constituintes dos óleos essenciais são os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) (BAKKALI et al., 2008; DIMA; DIMA, 2015; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os terpenóides são terpenos contendo oxigênio e são classificados em fenóis, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, óxidos, lactonas e éteres (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

QUADRO 1. COMPONENTES MAJORITÁRIOS (>10%) DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALGUMAS ESPÉCIES DE EUGENIA.

Espécie	Componente Majoritário (%)	Referência
<i>E. bacopari</i> (guamirim)	Aromadendreno (12.2), δ -cadineno (15.8)	(APEL et al., 2002)
<i>E. beaurepaireana</i> (ingá-baú uvaia rugosa)	Bicyclogermacreno (14.3)	(APEL et al., 2004a)
<i>E. brasiliensis</i> (grumixama)	β -cariofileno (8.7 – 12.6), β -selineno (12.6-17.3), α -selineno (13.3-14.8)	(FISCHER et al., 2005)
<i>E. chlorophylla</i> (guamirim-pitanga)	β -cariofileno (12.8), α -cadinol (10.1)	(STEFANELLO et al., 2008)
<i>E. dysenterica</i> (cagaita)	β -cariofileno (22.0 – 37.0), γ -cadineno (11.0 – 16.0)	(DUARTE et al., 2009)
<i>E. florida</i> (guamirim-cereja)	Germacreno D (10.4), Biciclogermacreno (10.9)	(APEL et al., 2004b)
<i>E. hyemalis</i> (guamirim-burro)	Biciclogermacreno (37.7)	(APEL et al., 2004b)
<i>E. involucrata</i> (cereja-do-rio-grande)	β -cariofileno (23.1), viridifloreno (36.2)	(HENRIQUES et al., 1993)
<i>E. mattosii</i> (cambuí-peba)	β -Elemene (16.1), β -cariofileno (12.4), Biciclogermacreno (17.5), α -cadinol (11.2)	(APEL et al., 2005)
<i>E. moraviana</i> (cambuí)	β -elemeno (11.8), β -cariofileno (14.5)	(APEL et al., 2002)
<i>E. uniflora</i> (pitanga)	(E)- β -Ocimeno (10.5), germacreno D (29.3), Biciclogermacreno (22.4)	(APEL et al., 2004a)
<i>E. puniceifolia</i> (cereja-do-cerrado)	β -cariofileno (23.6 – 32.9)	(MAIA; ZOGHBI; LUZ, 1997)
<i>E. pyriformis</i> (uvaia)	Biciclogermacreno (10.2), δ -cadineno (12.4), epi- α -cadinol (11.9)	(APEL et al., 2004c)
<i>E. repanda</i> (pitanguinha)	β -cariofileno (16.3), aromadendreno (10.2)	(APEL et al., 2002)

<i>E. speciosa</i> (laranjinha-do-mato)	α -Pineno (47.3), limoneno (23.0), bicliclogermacreno (11.1)	(APEL et al., 2004a)
<i>E. umbelliflora</i> (apê-açu)	α -Pineno (24.7), β -pineno (11.0), β -cariofileno (14.6)	(APEL et al., 2002)

3.3.4 Propriedades antimicrobianas

Na natureza, os óleos essenciais são produzidos em resposta a alguma condição de estresse sofrido pela planta, como por exemplo, a infecção por micro-organismos, a ação de algum predador ou por deficiência hídrica (BETTAIEB REBEY et al., 2012). Estudos *in vitro* confirmam que os óleos essenciais apresentam diversas atividades antimicrobianas (BOUZABATA et al., 2013; DA SILVA et al., 2015; ESSID et al., 2015; GAVANJI et al., 2015; SETH et al., 2012) além de outras atividades biológicas, como por exemplo, anticâncer (ASIF et al., 2016; BAYALA et al., 2014), antidiabética (YEN et al., 2015), anti-inflamatória (MIGUEL, 2010), antimutagênica (SARAC; UGUR; SEN, 2015) e antioxidante (DUARTE et al., 2016; ZENGİN; BAYSAL, 2014). Deste modo, os óleos essenciais se apresentam como moléculas promissoras e que podem ser exploradas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Dada a variedade de componentes químicos presentes nos óleos essenciais, a sua atividade antimicrobiana não é atribuída a apenas um único componente específico, mas a ação sinérgica de muitos deles (BAKKALI et al., 2008). Além desta ação combinada dos componentes do óleo essencial, a sua atividade contra micro-organismos depende do caráter anfipático do óleo e do tipo de organismo que ele está combatendo (BASER; BUCHBAUER, 2010).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais de plantas pode ser atribuída à presença de alguns componentes como carvacrol, timol, pineno, eugenol e linalol (AIDA; ALI; BEHROOZ, 2015; BARRETO et al., 2014; BOUZABATA et al., 2013; HAN et al., 2015; HUSSAIN et al., 2008; MAGINA et al., 2009; SIEBERT et al., 2015). Por exemplo, 85% do óleo essencial de alho são compostos pelo eugenol e sendo assim, é provável que este constituinte majoritário esteja relacionado com a atividade antimicrobiana deste óleo. O óleo essencial total de alho e o seu componente majoritário eugenol mostraram atividade inibitória contra *Candida* e *Aspergillus* (PINTO et al., 2009).

O óleo essencial de alfavaca (*Ocimum sanctum*) inibe significativamente a alteração morfológica de levedura para hifa de *Candida albicans*, prevenindo assim, o estágio inicial do processo de infecção deste micro-organismo (KHAN et al., 2014). Além disso, este óleo também foi capaz de inibir o efeito de proteinases de *C. albicans* na membrana celular das células dos hospedeiros. Algumas linhagens de dermatófitos também apresentam inibição frente a óleos essenciais. O óleo essencial de *Nigella sativa* possui efeito contra linhagens de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum* (MAHMOUDVAND et al., 2014).

3.3.5 Mecanismo de ação

Embora a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em diversos micro-organismos já esteja comprovada por diferentes estudos científicos ao longo dos anos, o modo como os mesmos atuam ainda é incerto. Vários estudos já propuseram que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é devida ao seu caráter lipofílico. Sendo assim, os mesmos são capazes de penetrar nas membranas bacterianas e causar um colapso geral na célula por meio do extravasamento do material intracelular (CALO et al., 2015).

Nas bactérias Gram-negativas, o óleo essencial desintegra a sua membrana externa liberando polissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática à adenosina trifosfato (ATP) (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Já nas bactérias Gram-positivas, a interação do óleo essencial com a membrana da bactéria é capaz de alterar a permeabilidade aos íons H^+ e K^+ , reduzindo o potencial de membrana e acarretando um colapso da bomba de próton e depleção do estoque de ATP. A diminuição de gradientes de íons danifica os processos essenciais na célula levando a morte celular (REYES-JURADO et al., 2014; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Geralmente, a ação do óleo essencial nas bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* é mais eficaz do que em bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, uma vez que, estas possuem uma membrana externa que dificulta a penetração do óleo essencial e, além disso, o espaço periplasmático das mesmas contém enzimas capazes de degradar moléculas estranhas (KOKOSKA et al., 2002; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010). No entanto, no estudo de

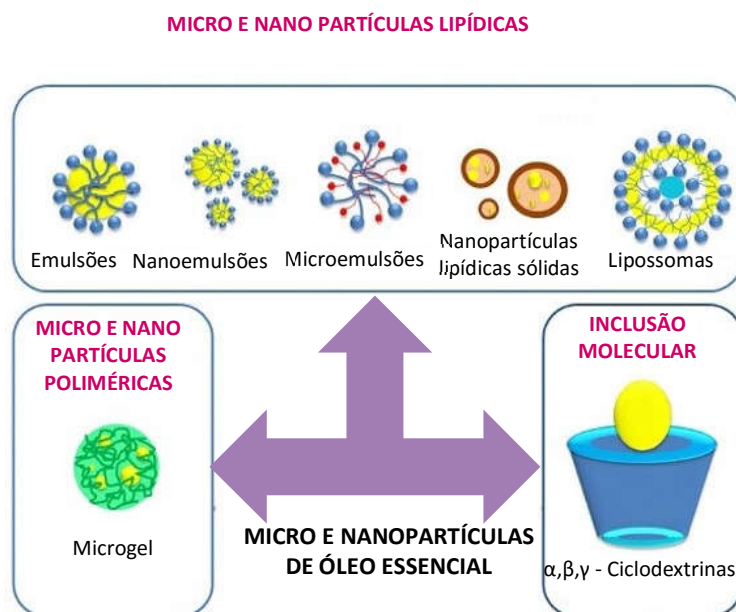
MAGINA et al. (2009), o óleo essencial de *Eugenia beaurepaireana* foi mais eficaz contra *P. aeruginosa* e *Escherichia coli* do que contra *S. aureus*.

3.3.6 Encapsulamento

Os óleos essenciais possuem alta volatilidade e além disso, os seus componentes podem se degradar quando expostos a condições ambientais, tais como, calor, humidade, luz ou oxigênio durante o processamento e/ou armazenamento do óleo. Neste sentido, a encapsulação do óleo essencial em carreadores se apresenta como uma abordagem plausível e eficiente para aumentar a estabilidade física, diminuir a sua volatilidade, aumentar a bioatividade e reduzir a toxicidade do óleo essencial (BILIA et al., 2014; CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013; GUERRA-ROSAS et al., 2016; MOGHIMI et al., 2016; RĂILEANU et al., 2013).

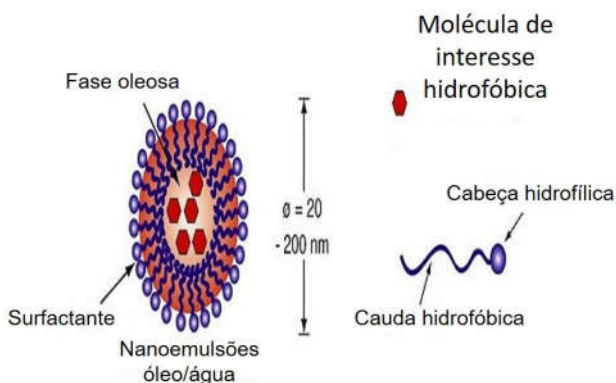
Diversos tipos de estratégias podem ser utilizadas para a encapsulação do óleo essenciais, tais como: nanopartículas poliméricas, lipossomas, emulsões e complexação molecular com ciclodextrinas (BILIA et al., 2014; DIMA; DIMA, 2015) (Figura 6).

FIGURA 6. MICRO E NANOSSISTEMAS UTILIZADOS PARA ENCAPSULAR ÓLEO ESSENCIAL (FONTE: ADAPTADO DE DIMA; DIMA, 2015).



Dentre os sistemas de nanopartículas lipídicas disponíveis para a veiculação de óleos essenciais podemos destacar as nanoemulsões. Estas são dispersões cineticamente estáveis compostas de óleo, água e agentes surfactantes e que possuem um diâmetro médio de gota entre 20 e 200 nm (RAJALAKSHMI; MAHESH; KUMAR, 2011; YANG; CHO; PARK., 2009). Dependendo das proporções utilizadas destes constituintes, as nanoemulsões podem existir sob diferentes estruturas e fases tais como: dispersões de óleo em água (O/A), dispersões água em óleo (A/O), dispersões homogêneas trifásicas O/A e A/O e dispersões homogêneas monofásicas O/A e A/O (WINSOR, 1948) (Figura 7).

FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA (FONTE: ADAPTADO DE M.R. MANGALE et al., 2015).



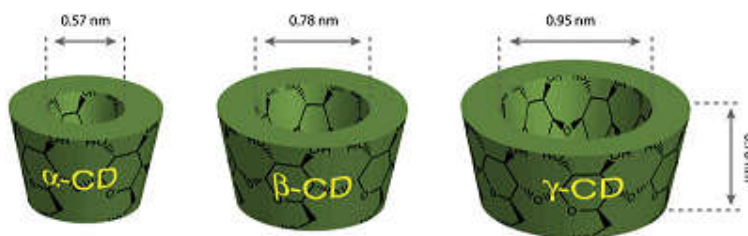
Os surfactantes iônicos e não-iônicos podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto para estabilizar o sistema. O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e o parâmetro de empacotamento crítico (PEC) são fatores importantes para a seleção do surfactante mais adequado. O EHL é uma medida da contribuição relativa da fração hidrofílica e lipofílica da molécula do surfactante. Valores de EHL entre 3 e 6 geralmente favorecem a formação de sistemas A/O e entre 8 e 18 são favorecidos a formação de sistemas O/A (LAWRENCE; REES, 2000). Já o PEC leva em consideração a geometria molecular do surfactante e sendo assim, é uma ferramenta útil capaz de prever a estrutura que será formada (ABOOFAZELI; LAWRENCE, 1994).

Devido ao seu tamanho reduzido, as partículas das nanoemulsões são capazes de penetrar e romper a membrana de células procariotas, vírus e células eucarióticas

de fungos (BILIA et al., 2014) e, desse modo, podem agir de forma sinérgica e aumentar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (MOGHIMI et al., 2016; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015; ZAHÍ; LIANG; YUAN, 2015).

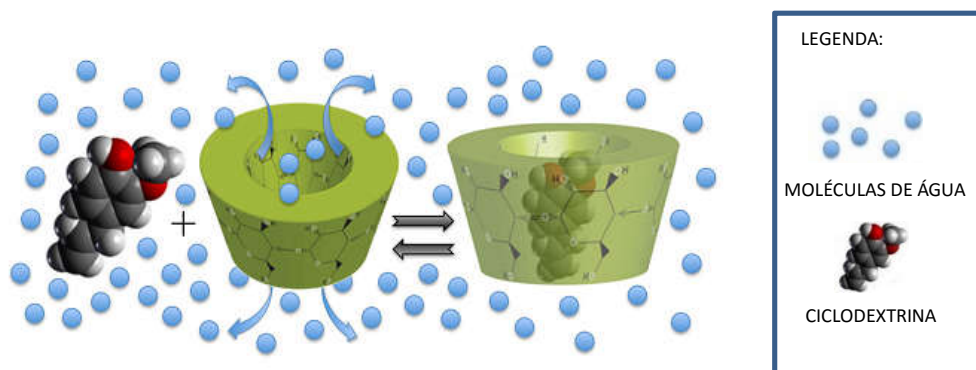
Uma outra estratégia bastante simples para o encapsulamento de óleos essenciais é a complexação molecular com ciclodextrinas. Existem três principais estruturas de ciclodextrinas: α -, β -, e γ -ciclodextrinas. Estas são oligossacarídeos formados por unidade repetidas de glucopiranosose ligadas por ligações α -(1,4) e que possuem uma conformação cilíndrica com cavidade interna hidrofóbica e cavidade externa hidrofílica (SZENTE, L., & SZEJTLI, 2004) (Figura 8).

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA α , β E γ -CICLODEXTRINAS MOSTRANDO, RESPECTIVAMENTE, AS DIMENSÕES DA CAVIDADE INTERNA DE 0,57, 0,78 E 0,95 nm (FONTE: CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013).



Este caráter anfipático das ciclodextrinas permite simultaneamente a encapsulação, dentro de suas cavidades, de moléculas hidrofóbicas formando complexos de inclusão e a solubilização em água. A formação do complexo de inclusão dá-se sobretudo pela substituição das ligações desfavoráveis, entre moléculas de água e a cavidade interna das ciclodextrinas, por ligações favoráveis, formadas pelas moléculas hidrofóbicas. Entretanto, outros tipos de forças estão envolvidas, tais como: interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, forças dipolo-dipolo e interações eletrostáticas e forças de van der Waals (SZEJTLI, 1998) (Figura 9).

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS POR MEIO DO DESLOCAMENTO DE MOLÉCULAS DE ÁGUA E SUBSTITUIÇÃO PELA MOLÉCULA CONVIDADA HIDROFÓBICA (FONTE: MURA, 2014).



A avaliação da formação de um complexo de inclusão no estado sólido exige o uso de diferentes técnicas analíticas cujos resultados devem ser examinados e avaliados em conjunto. Para isso, se faz necessário a preparação de uma mistura física entre os mesmos componentes usados na inclusão molecular para ser usado como um controle e aferir se houve ou não a formação real de um complexo de inclusão. Sendo assim, as principais técnicas utilizadas para este propósito são: as técnicas de análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial e análises termogravimétrica), difração de raios X em pó e técnicas de espectroscopia (MURA, 2015).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é considerado o método de análises térmicas mais utilizado quando se quer investigar a interação entre moléculas e ciclodextrinas no estado sólido (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; NOVÁK et al., 2006). O resultado desta análise fornece curvas termais das amostras que mostram informações sobre modificações nas propriedades físicas e energéticas das mesmas. As ciclodextrinas, por exemplo, quando submetidas à análise de DCS, apresentam um pico endotérmico entre 90 e 130 °C, correspondente a sua desidratação, e um pico da decomposição após os 300 °C (MURA, 2015).

As análises termogravimétricas (ATG) são utilizadas para corroborar as informações obtidas por DSC. Por meio desta análise, é possível visualizar o efeito da variação de temperatura na mudança de massa na amostra (NOVÁK et al., 2006). Nas ciclodextrinas ocorre uma perda de massa aproximadamente entre 100 e 300 °C (GALVÃO et al., 2015; MENEZES et al., 2014). O aumento de estabilidade da

molécula encapsulada nas ciclodextrinas geralmente é mostrado nas curvas deste tipo de análises (MURA, 2015).

Já a técnica de difração de raios X é utilizada na caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas para determinar o grau de cristalinidade ou amorfização de amostras. Esta técnica também deve ser utilizada comparando os resultados da amostra que se presume ser o complexo de inclusão com a amostra da mistura física. Novos picos ou diferenças de intensidade nos picos de difração pré-existent são indicativos de formação de um novo estado sólido e, por conseguinte, a formação do complexo de inclusão (MURA, 2015).

Apesar de inúmeras similaridades entre as principais ciclodextrinas, o que faz com que a mesma seja denominada de α -, β -, ou γ -ciclodextrina é o tamanho de sua cavidade interna que, por sua vez, é determinado pela quantidade de unidades de glucopirranose que possuem (SZENTE, L., & SZEJTLI, 2004). A β -ciclodextrina possui sete unidades glucopirranose e é uma das ciclodextrinas mais utilizadas para o encapsulamento de óleo essencial devido às dimensões de sua cavidade interna (0.5-0.8 nm), eficiência na complexação, disponibilidade e baixo custo (D. DUCHÊNE; G. PONCHEL, 1999). A complexação de óleo essencial com ciclodextrina aumenta a solubilidade do óleo essencial, além de protegê-lo das condições ambientais. Estes complexos moleculares formados entre óleos essenciais e ciclodextrinas têm sido utilizados para fins farmacêuticos, alimentícios e cosméticos (BILIA et al., 2014).

3.4 IMPACTO MUNDIAL DAS INFECÇÕES POR DERMATÓFITOS E LEVEDURAS

As infecções fúngicas que acometem o homem são doenças bastante comuns e que podem se manifestar desde infecções superficiais leves até graves infecções sistêmicas com altas taxas de morbidade e mortalidade. Também conhecidas como micoses, as infecções fúngicas são classificadas em superficiais, subcutâneas e invasivas (HAY, 2006).

As micoses superficiais que acometem a pele e as unhas são a causa mais comum de doenças ocasionadas por fungos e afetam aproximadamente 25% da população mundial - ocorrendo tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos imunocomprometidos (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Entre as micoses superficiais, destaca-se a dermatofitose causada por fungos queratinofílicos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e embora a maioria não cause

nenhum risco de morte, trazem grande desconforto e isolamento social do paciente (BROWN et al., 2012; HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Os dermatófitos colonizam tecidos queratinizados produzindo uma reação que, dependendo da virulência do patógeno pode variar de leve a intensa (AMEEN, 2010; HAINER, 2003). As infecções fúngicas superficiais são endêmicas em regiões tropicais e são transmitidas pelo contato direto com a superfície infectada (SHRUM; MILLIKAN; BATAINEH, 1994).

Um outro tipo bastante comum de infecção fúngica superficial é a candidíase vulvovaginal. Esta infecção é a principal doença clínica ocasionada por espécies da levedura *Candida* e se estima que 70-75% das mulheres no mundo serão acometidas por esta infecção pelo menos uma vez em suas vidas (SOBEL, 2007). As espécies de *Candida* com maior importância médica são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (LYON et al., 2010b; PFALLER et al., 2012, 2011; SILVA et al., 2011; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; YAPAR, 2014). Além de ocasionar estas infecções superficiais, as espécies de *Candida* são os agentes de etiologia fúngica mais comuns em infecções invasivas, possuem alta taxa de morbidade e mortalidade e sendo assim, são o primeiro maior agente causador de infecções micóticas (VALLABHANENI et al., 2016). Em torno de 10% dos pacientes em UTI desenvolvem candidíase sistêmica (KETT et al., 2011; PFALLER et al., 2012; VINCENT et al., 2009).

Aproximadamente dois milhões de pessoas por ano no mundo morrem devido a alguma infecção fúngica invasiva ocasionadas, na maioria dos casos, pelos gêneros *Cryptococcus* e *Candida* (BROWN et al., 2012). As espécies do gênero *Cryptococcus* podem causar criptococose, uma micose de porta de entrada inalatória (BYRNES et al., 2011). A maioria dos pacientes com criptococose possuem deficiência imune causada pela síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) e/ou por medicação imunossupressiva. Estes patógenos podem se disseminar e invadir o sistema nervoso central e causar meningoencefalite tanto em indivíduos susceptíveis como em indivíduos competentes. A mortalidade estimada de meningite criptocócica é de 600 mil mortes por ano (PARK et al., 2009; SABIITI; MAY, 2012).

Os agentes antifúngicos utilizados atualmente para tratar as infecções fúngicas possuem espectro de atividade variável em relação a espécie fúngica a ser tratada. A maioria destes agentes antifúngicos tem como alvo algum componente responsável

pela fluidez e integridade da membrana plasmáticas das células fúngicas (NETT; ANDES, 2015).

A Anfotericina B possui diferentes formulações e é utilizada para tratamento de infecção fúngica sistêmica. A mesma interage com o ergosterol, o esterol mais abundante encontrado na membrana celular dos fungos, intercala-se na membrana plasmática e forma canais que favorecem o desequilíbrio iônico da célula fúngica (ARIKAN; REX, 2001). A anfotericina B é um dos antifúngicos mais potentes e apresenta atividade contra as espécies de *Cryptococcus*, fungos dismórficos e contra a maioria das espécies de *Candida* e *Aspergillus* (DIEKEMA et al., 2003; LI et al., 2000; MCGINNIS et al., 2001; PFALLER et al., 2003, 2005; SABATELLI et al., 2006).

Os antifúngicos azóis bloqueiam a síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase e desregulam a integridade da membrana pelo acúmulo de precursores de esterol e a redução de ergosterol (HEIMARK et al., 2002; MUNAYYER et al., 2004). Cetoconazol, fluconazol e itraconazol são exemplos bastante conhecidos desta classe de antifúngicos, pois são utilizadas para tratamento de infecções superficiais, como por exemplo, a candidíase vulvovaginal (GHANNOUM; RICE, 1999; SARDI et al., 2013).

Os agentes antifúngicos classificados como fluoropirimidinas (flucitosina) e equinocadinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), atuam, respectivamente, na inibição de ácidos nucleicos (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002; PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012) e na parede celular fúngica inibindo a biossíntese da α -1,3-D-glucano, um polissacarídeo de parede celular essencial para muitos fungos (PERLIN, 2011; SANGLARD; ODDS, 2002).

Devido ao aumento de cepas resistentes à todas as drogas antifúngicas disponíveis comercialmente (PERFECT; COX, 1999; PFALLER; DIEKEMA, 2007), como também, aos vários efeitos adversos atribuídos a muitas destas drogas (ASHLEY et al., 2006; BATES et al., 2001; CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006; CLEMENTS; PEACOCK, 1990; GUBBINS et al., 2006; SLAVIN et al., 1995; ULLMANN et al., 2006; VAZQUEZ; SOBEL, 2006; VERMES, 2000) faz-se necessário a busca por terapias antifúngicas alternativas que possam suplantar os mecanismos de resistência reportados até o momento.

3.5 *EUGENIA BREJOENSIS*

A família Myrtaceae é uma das maiores famílias de plantas angiospérmicas do mundo com 132 gêneros e 5.671 espécies (GOVAERTS et al., 2014). No Brasil, esta família está distribuída geograficamente em todas as regiões sendo representada por 23 gêneros e 1.034 espécies (SOBRAL et al., 2015).

Assim, a família Myrtaceae constitui-se como uma família muito importante para a economia local das regiões brasileiras onde as diferentes espécies são cultivadas. Por exemplo, as espécies do gênero *Eucalyptus* são utilizadas como fontes de madeira e lenha. Existem também as espécies que produzem frutos comestíveis e/ou essências utilizadas na indústria alimentícia e de cosméticos, como exemplo, *Eugenia uniflora* (pitanga), *Psidium guajava* (goiaba) e *Eugenia luschnathiana* (pitomba) (KÄHKÖNEN; HOPIA; HEINONEN, 2001; LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Adicionalmente, algumas espécies da família Myrtaceae são popularmente utilizadas como agentes antidiarreicos, antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999; OGUNWANDE et al., 2005). Um dos gêneros da família Myrtaceae que possui o maior número de espécies, e devido a isso, é um dos mais estudados é o gênero *Eugenia*. No Brasil, o gênero *Eugenia* é representado por 388 espécies.

A *Eugenia brejoensis* é uma espécie endêmica da região Nordeste do Brasil e que foi primeiramente descrita no município pernambucano de Brejo da Madre de Deus (MAZINE; SOUZA, 2008). Atualmente, além dos estados nordestinos da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, a *E. brejoensis* está presente no sudeste brasileiro no estado do Espírito Santo (GIARETTA; PEIXOTO, 2014).

Popularmente, a *E. brejoensis* é conhecida como “cutia” e as suas folhas, frutos e caule são utilizados pela medicina popular para tratamento de diarreia, febre e reumatismo. Laboratorialmente, a ação antimicrobiana de *E. brejoensis* contra algumas bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*) foi comprovada por meio da utilização dos extratos obtidos de ramos, folhas e frutos de *E. brejoensis* (AZEVEDO et al., 2012). Além disso, o óleo essencial extraído das folhas da *E. brejoensis* apresentou atividade larvívica contra o mosquito *Aedes aegypti* (DA SILVA et al., 2015).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, R. L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complex containing an essential oil component. **Food Chem**, v. 196, p. 968–975, 2016.
- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. e51–e56, jun. 2014.
- ABOOFAZELI, R.; LAWRENCE, M. Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions .2. Pseudo-Ternary Phase-Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Isopropyl Myristate and Alcohol - Influence of Purity of Lecithin. **International journal of pharmaceutics**, v. 106, n. 1, p. 51–61, 1994.
- ACHAKZAI, A. K. K. et al. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 2129–2135, 2009.
- AGOSTINI-COSTA, T. DA S. et al. **Secondary Metabolites, Chromatography and Its Applications**. [s.l.] InTech, 2012.
- AIDA, A.; ALI, M. S.; BEHROOZ, M. V. Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of *Zataria multiflora* Boiss endemic in Khorasan-Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 3, p. 181–185, 2015.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 197–201, 2010.
- ANGIONI, A. et al. Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. **J. Agric. Food Chem**, 2006.
- APEL, M. A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils from Southern Brazilian *Eugenia* Species. Part IV: Section *Racemulosae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 3, p. 259–262, 2002.
- APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section *Dichomatae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 191–192, 2004a.
- APEL, M. A. et al. Essential oils composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*.

Journal of Essential Oil Research, v. 16, p. 321–322, 2004b.

APEL, M. A. et al. Essential Oils from *Eugenia* Species—Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 135–138, 2004c.

APEL, M. A. et al. Volatile Constituents of *Eugenia mattosii* Legr (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 3, p. 284–285, 2005.

ARIKAN, S.; REX, J. H. Lipid-based antifungal agents: current status. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 5, p. 393–415, mar. 2001.

ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **Int J Pharm**, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, 2015.

ASHLEY, E. S. D. et al. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 1, p. S28–S39, 1 ago. 2006.

ASIF, M. et al. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 156–161, mar. 2016.

ASSAMI, K. et al. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 62, p. 99–105, dez. 2012.

AZEVEDO, P. R. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2000.

BARRETO, H. M. et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 290–294, 2014.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Taylor & F ed. [s.l: s.n.].

BATES, D. W. et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 5, p. 686–93, 1 mar. 2001.

BAYALA, B. et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American journal of cancer research**, v. 4, n. 6, p. 591–607, jan. 2014.

BETTAIEB REBEY, I. et al. Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. **Industrial Crops and**

Products, v. 36, n. 1, p. 238–245, mar. 2012.

BHARGAVA, K. et al. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69–73, 2015.

BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2014, p. 651593, 29 maio 2014.

BOUZABATA, A. et al. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 3, p. 613–620, 2013.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 11, p. 895–907, 2011.

CALO, J. R. et al. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems— A Review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, jan. 2015.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 24 jun. 2002.

CETIN, B. et al. Chemical Composition of Hydrodistilled Essential Oil of *Artemisia incana* (L.) Druce and Antimicrobial Activity against Foodborne Microorganisms. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 2302–2310, 2009.

CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. Micafungin: a new echinocandin. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 8, p. 1171–8, 15 abr. 2006.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chem**, v. 172, p. 298–304, 2015.

CIOBANU, A.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 110–114, ago. 2013.

CLEMENTS, J. S.; PEACOCK, J. E. Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity. **The American journal of medicine**, v. 88, n. 5N, p. 22N–27N, maio 1990.

- COLE, R. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. **J Nat Med**, v. 61, n. 4, p. 414–417, 2007.
- COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.
- CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33–9, jul. 1999.
- CSERHÁTI, T. **Chromatography of aroma compounds and fragrances**. New York: Springer, 2010.
- D. DUCHÊNE, D. W.; G. PONCHEL. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 1-2, p. 263–268, 1999.
- DA SILVA, A. G. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441–1447, 2 nov. 2015.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745–2749, 1 abr. 2006.
- DI PASQUA, R. et al. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863–4870, 1 jun. 2007.
- DIEKEMA, D. J. et al. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623–6, ago. 2003.
- DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, out. 2015.
- DUARTE, A. et al. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. **Food Control**, v. 61, p. 115–122, mar. 2016.
- DUARTE, A. R. et al. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **J Braz Chem Soc**, v. 20, p. 967–974, 2009.
- ESSID, R. et al. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 795–802, dez.

2015.

FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 6, p. 494–504, nov. 2007.

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1-3, p. 53–58, dez. 2004.

FILLY, A. et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: from laboratory to pilot and industrial scale. **Food chemistry**, v. 150, p. 193–8, 1 maio 2014.

FISCHER, D. C. H. et al. Essential Oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 5, 2005.

FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; DA SILVA, C. DE B. Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, 19 out. 2015.

FONTENELLE et al. Alkylphenol activity against *Candida* spp and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 6422–6431, 2011.

FOURMENTIN, S. et al. Space filling of beta-cyclodextrin and beta-cyclodextrin derivatives by volatile hydrophobic guests. **beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 1185–1191, 2013.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal**, 2010.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 20 maio 2015.

GAVAHIAN, M. et al. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 50–58, abr. 2015.

GAVANJI, S. et al. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 3, p. 62–68, set. 2015.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical**

microbiology reviews, v. 12, n. 4, p. 501–17, out. 1999.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. New records of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) and complementary description. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1176–1178, 2014.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123–151, 14 dez. 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. lantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOVAERTS, R. et al. **World Checklist of Myrtaceae**. UK: Royal Botanic Gardens: Kew, 2014.

GUBBINS, P. O. et al. Pharmacokinetics and safety of oral posaconazole in neutropenic stem cell transplant recipients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1993–9, jun. 2006.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438–446, jan. 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, fev. 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, ago. 2008.

HĂDĂRUGĂ, D. I. et al. Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. essential oil/ β -cyclodextrin supramolecular system. **beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 2809–2820, 2014.

HAINER, B. L. Dermatophyte Infections. **American Family Physician Journal**, v. 67, n. 1, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. In: **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 255–306.

HAN, Y. et al. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Phellodendron amurense* (Rupr.) from China. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 841–844, 2015.

HAVLICKOVA, B.; CZAİKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin

- mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, p. 2–15, 2008.
- HAY, R. J. Fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 201–2012, 2006.
- HEIMARK, L. et al. Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 37, n. 3, p. 265–9, mar. 2002.
- HENRIQUES, T. et al. Aromatic Plants from Brazil. II. The Chemical Composition of Some Eugenia Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, n. 5, p. 501–505, 1993.
- HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraal b ed. Utrecht/Reus, Netherland: [s.n.].
- HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem**, v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.
- JIANG, H. et al. NMR Investigations of Inclusion Complexes between β -Cyclodextrin and Naphthalene/Anthraquinone Derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 133–138, 29 ago. 2006.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antimicrobial and antifungal properties of essential oils. **Curr. Med. Chem.**, v. 10, p. 813–829, 2003.
- KETT, D. H. et al. Candida bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study*. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 4, p. 665–670, 2011.
- KFOURY, M. et al. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatografic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chem**, v. 164, p. 454–461, 2014.
- KFOURY, M. et al. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 264–272, out. 2015.
- KHAN, A. et al. *Ocimum sanctum* essential oil inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 448–452, 2014.
- KLIEBENSTEIN, D. J. Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 1–6, 2012.
- KOKOSKA, L. et al. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 82, n. 1, p. 51–53, 2002.
- KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Static headspace-gas chromatography: Theory and**

prattice. second ed. [s.l: s.n.].

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi.

The Lancet, v. 359, n. 9312, p. 1135–1144, 30 mar. 2002.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89–121, 6 dez. 2000.

LI, R. K. et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*.

Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 44, n. 6, p. 1734–6, jun. 2000.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515–522, jun. 2014.

LYON, G. M. et al. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1270–1275, 2010a.

LYON, G. M. et al. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1270–5, abr. 2010b.

M.R.MANGALE et al. Nanoemulsion: As Pharmaceutical Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 46, p. 244–252, 2015.

MAGINA, M. D. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **J Nat Med**, v. 63, n. 3, p. 345–350, 2009.

MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. **Journal de mycologie médicale**, v. 25, n. 2, p. e65–71, jun. 2015.

MAHMOUDVAND, H. et al. Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. **Journal de mycologie médicale**, v. 24, n. 4, p. e155–61, dez. 2014.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential Oil of *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, 1997.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313–326, 2010.

MASOTTI, V. et al. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the

Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. 2003.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 4, p. 775–777, 2008.

MCGINNIS, M. R. et al. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical mycology**, v. 39, n. 4, p. 369–71, ago. 2001.

MENEZES, P. P. et al. Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2429–2437, 2014.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 12, p. 9252–87, 15 jan. 2010.

MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 182–9, 17 abr. 2009.

MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chem**, v. 194, p. 410–415, 1 mar. 2016.

MOURA, L. S. et al. Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, n. 3, p. 212–219, out. 2005.

MUNAYYER, H. K. et al. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 α -demethylation in yeasts and molds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3690–6, out. 2004.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 226–38, 10 set. 2015.

NAKATSU, T. et al. Biological activity of essential oils and their constituents. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 21, p. 571–631, 2000.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 28 dez. 2015.

NEWMAN, D. J. Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589–2599, maio 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335,

23 mar. 2012.

NOVÁK, C. et al. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 3, p. 693–701, 2006.

NYEGUE, M. A. et al. CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF EUGENIA CARYOPHYLLA AND MENTHA SP CF PIPERITA AND THEIR IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITIES ON SIX HUMAN PATHOGENIC FUNGI. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 11, n. 6, p. 40–46, 2014.

OGUNWANDE, I. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147–152, 2005.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chem**, v. 120, n. 1, p. 308–312, 2010.

OMS. <WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf>WHO Centre for Health and Development, , 2000.

OMS. **WHO Global Atlas on Traditional, Complementary and Alternative Medicine**. WHO Centre for Health and Development, , 2005.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009.

PATERAKI, I.; KANELIS, A. K. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 6, p. 629–641, 2010.

PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, jan. 2012.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 2, n. 4, p. 259–269, 8 ago. 1999.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 441–457, abr. 2011.

PETRETTO, G. L. et al. Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. *Leucocarpa* DC and var. *Melanocarpa* DC. **Food Chemistry**, v. 197, p. 124–131, abr. 2016.

PFALLER, M. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 74, n. 4, p. 323–331, 2012.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 78–83, jan. 2003.

PFALLER, M. A. et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163–7, maio 2005.

PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65–69, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, p. 237–243, 2001.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1367–73, 2006.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 11, p. 1454–1462, 2009.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 1311–20, 2013.

PINTO, E. et al. Activity of *Thymus caespititius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 107–112, 2014.

RĂILEANU, M. et al. A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 6, p. 3281–3288, 1 ago. 2013.

RAJALAKSHMI, R.; MAHESH, K.; KUMAR, C. K. A. A CRITICAL REVIEW ON NANO

- EMULSIONS. **International Journal of Inovative Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2011.
- RATH, C. C.; MOHAPATRA, S. Susceptibility characterisation of *Candida* spp. to four essential oils. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 93–96, 2015.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- REYES-JURADO, F. et al. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. **Food Engineering Reviews**, 2014.
- RODRIGUES, K. A. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 279726, 2013.
- SABATELLI, F. et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009–15, jun. 2006.
- SABIITI, W.; MAY, R. C. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35455, jan. 2012.
- SAJJADI, S.; ZERFA, M.; W. BROOKS, B. Dynamic behaviour of drops in oil/water/oil dispersions. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 4, p. 663–675, fev. 2002.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 105, p. 8–16, jul. 2015.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, fev. 2002.
- SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583–592, 2015.
- SARAC, N.; UGUR, A.; SEN, B. In vitro antimutagenic activity of *Vitex agnus-castus* L. essential oils and ethanolic extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 100–103, jan. 2015.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of**

- medical microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, 1 jan. 2013.
- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979–990, 23 ago. 2012.
- SCOTLAND, R. W.; WORTLEY, A. H. How Many Species of Seed Plants Are There? **Taxon**, v. 52, n. 1, p. 101–104, 2003.
- SETH, R. et al. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil and extracts of *Lantana camara* Linn. from Uttarakhand (India). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1407–S1411, 2012.
- SHERF, A. F. A method for maintaining *Phytophthora* for long periods without transference. **Phytopathology**, v. 3, p. 30–32, 1943.
- SHRUM, J. P.; MILLIKAN, L. E.; BATAINEH, O. Superficial fungal infections in the tropics. **Dermatologic Clinics Journal**, v. 4, p. 687–693, 1994.
- SIEBERT, D. A. et al. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Nat Prod Res**, v. 29, n. 3, p. 289–292, 2015.
- SILVA, F. et al. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 42–7, 15 dez. 2011.
- SIMBAR, M. et al. A comparative study of the therapeutic effects of the *Zataria multiflora* vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 12, p. 1025–31, dez. 2008.
- SLAVIN, M. A. et al. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation--a prospective, randomized, double-blind study. **The Journal of infectious diseases**, v. 171, n. 6, p. 1545–52, jun. 1995.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.
- SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 30 dez. 2015.
- SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71–78, 2015.
- STEFANELLO, M. E. A. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of

- Essential Oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 1, p. 75–78, 2008.
- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73–94, 2011.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Review**, v. 98, n. 5, p. 1743–1753, 1998.
- SZENTE, L., & SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 137–142, 2004.
- TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal Investigations On Plant Essential Oils. A Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 19–28, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: ASSOCIATES, S. (Ed.). **Plant Physiol.** Fourth ed. Sunderland, MA: [s.n.].
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **J Food Sci**, v. 79, n. 7, p. R1231–49, 2014.
- TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.
- TURINA, A. DE. V et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101–113, 20 jul. 2006.
- ULLMANN, A. J. et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 658–66, 1 fev. 2006.
- V, D.; RAVICHANDRAN V. Nanoemulsion as modified drug delivery tool. **INTERNATIONAL JOURNAL OF COMPREHENSIVE PHARMACY**, v. 2, n. 1-6, 2011.
- VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1–11, mar. 2016.
- VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Anidulafungin: a novel echinocandin. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 2, p. 215–22, 15 jul. 2006.
- VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. et al. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of**

Dermatology : JDDG, v. 11, n. 5, p. 381–93; quiz 394, maio 2013.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105–113, dez. 2015.

VERMES, A. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 1 ago. 2000.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VIGAN, M. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 685–692, 2010.

VINCENT, J. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323–2329, 2009.

WANG, D. C. et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oils of *Metaplexis japonica* and their antibacterial components. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 449–457, 2015.

WINSOR, P. A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, n. 0, p. 376–398, 1948.

XI, J. et al. Preparation, Characterization and Pharmacokinetic Study of Xiangfu Siwu Decoction Essential Oil/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Molecules**, v. 20, p. 10705–10720, 2015.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 24, p. 1445–50, 2008.

YANG, H. J.; CHO, W. G.; PARK., S. A. Stability of oil-in-water nanoemulsion prepared using the phase inversion composition method. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 15, p. 331–335, 2009.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95–105, 2014.

YEN, H.-F. et al. In vitro anti-diabetic effect and chemical component analysis of 29 essential oils products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 1, p. 124–129, mar. 2015.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; PROKINOVA, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic

and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443–448, 2014.

ZAHİ, M. R.; LIANG, H.; YUAN, Q. Improving the antimicrobial activity of d-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. **Food Control**, v. 50, p. 554–559, abr. 2015.

ZENGİN, H.; BAYSAL, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17773–17798, 2014.

ZIZOVIĆ, I. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 338–346, jan. 2007.

ZORE, G. B. et al. Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e99–109, 2011.

ZUZARTE, M. et al. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 1505–1510, 2012.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis*
CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE DERMATÓFITOS E LEVEDURAS

Artigo a ser submetido à revista Phytotherapy Research (ISSN 1099-1573)

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE DERMATÓFITOS E LEVEDURAS

Nataly Amorim de Santana ^{a,b}, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto ^c, Janaina Viana de Melo ^b, Márcia Vanusa da Silva ^{a,d} e Giovanna Machado ^{a,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

^b Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz freire, 01 - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50.740-540.

^c Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

^d Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

*Autor para correspondência. Número Fax: +55 81 3334 7200

E-mail: nataly.amorim@gmail.com

Resumo

Este trabalho avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (OEB) frente a leveduras patogênicas de *Candida* e *Cryptococcus* e algumas espécies de dermatófitos. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram medidos de acordo com o protocolo de microdiluição em caldo CLSI M27-A3. O OEB apresentou atividade antifúngica contra todas as leveduras e dermatófitos testados. A CIM do OEB para as leveduras foi de 0,39 a 6,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e para as espécies de dermatófitos, os valores da CIM foram de 6,25 a 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Estudos adicionais serão necessários para avaliar a segurança do OEB como também, desenvolver um sistema de encapsulamento que o torne viável para utilização na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: atividade antifúngica; óleo essencial; *Eugenia brejoensis*.

1. Introdução

As infecções fúngicas que acometem o homem são doenças bastante comuns e que podem se manifestar desde leve infecções superficiais até graves infecções sistêmicas com altas taxas de morbidade e mortalidade. Também conhecidas como micoses, as infecções fúngicas são classificadas em superficiais, subcutâneas e invasivas (HAY, 2006).

As micoses superficiais afetam 25% da população mundial e são causadas principalmente por dermatófitos do gênero *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* situam-se como o segundo agente mais prevalente em infecções fúngicas. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* são as espécies com maior importância médica (LYON et al., 2010; PFALLER et al., 2012, 2011; SILVA et al., 2011; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; YAPAR, 2014). Estas espécies são responsáveis tanto por infecções superficiais como por infecções invasivas. A candidíase vaginal é a segunda causa mais comum de infecção vaginal e é a principal doença clínica ocasionada por espécies de *Candida*. Estima-se que 70-75% das mulheres no mundo serão acometidas por candidíase vaginal pelo menos uma vez em suas vidas e 40-50% sofrerão de infecções recorrentes (SOBEL, 2007).

Cerca de dois milhões de pessoas por ano no mundo morrem devido a alguma infecção fúngica invasiva ocasionadas, na maioria dos casos, pelos gêneros *Cryptococcus* e *Candida* (BROWN et al., 2012). As espécies do gênero *Cryptococcus* podem causar criptococose, uma micose de porta de entrada inalatória (BYRNES et al., 2011). A maioria dos pacientes com criptococose possuem deficiência imune causada pela síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) e/ou por medicação imunossupressiva. Estes patógenos podem se disseminar e invadir o sistema nervoso central e causar meningoencefalite em indivíduos susceptíveis. A mortalidade estimada de meningite criptocócica é de 600 mil mortes por ano (PARK et al., 2009; SABIITI; MAY, 2012).

Em casos de candidíase disseminada e criptococose, o tratamento inicial recomendado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas inclui derivados azólicos, caspofungina e Anfotericina B ou, em casos de reincidência, uma combinação de fluconazol e Anfotericina B.

O uso contínuo das drogas antifúngicas convencionais acarreta no desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos tornando, deste modo, a droga ineficaz (PERFECT; COX, 1999; PFALLER; DIEKEMA, 2007) . Sendo assim, existe a necessidade de encontrar novos tratamentos que tenham como alvo de ação sítios diferentes das drogas convencionais.

Com este propósito, os óleos essenciais extraídos de plantas têm sido examinados e a eficiência antifúngica de muitos deles já foi comprovada por diversos estudos (ABBASZADEH et al., 2014; CETIN et al., 2009; PINTO et al., 2009; TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013; ZABKA; PAVELA; PROKINOVA, 2014; ZORE et al., 2011; ZUZARTE et al., 2012).

A *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae) é uma espécie endêmica da “caatinga” semi-árida do nordeste do Brasil e cujos extratos apresentam ação antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*). A única atividade biológica conferida ao óleo essencial desta espécie é a atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (DA SILVA et al., 2015). Assim, neste estudo, será avaliado pela primeira vez, a atividade antifúngica do OEB contra isolados clínicos de leveduras e dermatófitos.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

O OEB foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os protocolos de extração e identificação química do óleo essencial utilizado neste trabalho já foram previamente descritos (DA SILVA et al., 2015).

2.2 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas vinte e duas linhagens de *Candida* e quatro linhagens de *Cryptococcus neoformans* obtidas de pacientes diagnosticados com candidemia e neurocriptococcose, respectivamente, em Hospital Público do Recife, Brasil, entre os meses de julho de 2012 e junho de 2013. As cinco espécies de

dermatófitos usadas foram obtidas de pacientes com dermatofitose cutânea no serviço dermatológico do Hospital das Clínicas, UFPE, Brasil. Todos os isolados avaliados neste trabalho estavam em óleo mineral (SHERF, 1943) na coleção de cultura URM da UFPE. Esta coleção está registrada no Centro Mundial de Dados sobre Micro-organismos (WDCM) da Federação Mundial de Coleções de Cultura (WFCC) sob o acrônimo URM (Universidade Recife Micologia) “604”.

2.3 Identificação fenotípica clássica

As colônias foram cultivadas em meio ágar dextrose Sabouraud com 2,5% de extrato de levedura (Difco, EUA) e avaliadas quanto a aspectos morfológicos, tais como, cor, forma, topologia de cada colônia e a morfologia da célula. A formação dos clamidóporos foi induzida através do cultivo em ágar Bili de boi (Difco, EUA) a 25 °C após 3 dias. Os isolados foram testados bioquimicamente por ensaios de assimilação e fermentação de carboidratos. A produção de uréase e ácido acético foram também avaliadas usando ureia e meio carbonato de cálcio (Difco, EUA), respectivamente. A temperatura máxima de crescimento para cada um dos isolados foi determinada. Todos os parâmetros fenotípicos clássicos foram analisados de acordo com (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; HOOG et al., 2000).

2.4 Identificação por MALDI-TOF MS

Os inóculos das células de levedura foram mantidos em meio YPD (extrato de levedura, peptona, glicose e ágar) e cultivados em atmosfera aeróbica durante 20 h a 37 °C. As culturas foram previamente avaliadas quanto a pureza e, em seguida, foram analisadas por Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS).

Uma placa contendo 196 poços (Bruker Daltonik GmbH) foi utilizada como suporte para as colônias analisadas. Primeiro, as colônias foram, individualmente, misturadas com 1 µL de ácido fórmico a 70% e colocadas sobre a placa. Em seguida, 1 µL de solução saturada de matriz {75mg/ml de α -4-ciano-hidroxicinâmico (CHCA) em etanol/água/acetoneitrila [1:1:1] com 0.03% de ácido trifluoroacético (TFA)} foi adicionada a preparação. A placa contendo as amostras foi deixada em temperatura

ambiente por cinco minutos para a secagem das amostras (LIMA-NETO et al., 2014). Um total de vinte isolados foram analisados em duplicata.

O equipamento utilizado foi o MALDI TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) equipado com um laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) de 1064 nm, ajustado a uma potência de 66%. As análises foram feitas em modo linear na faixa de massa entre 2.000 e 20.000 Da e aceleração de voltagem de +20 kV. A lista de picos resultantes foi exportada para o software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) onde foi feita a identificação final.

2.5 Sensibilidade antifúngica *in vitro*

Microdiluições em série foram preparadas de acordo com diretrizes do método de referência M27-A3 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008) para leveduras e M38-A2 (CLSI, 2008) para fungos filamentosos. O OEB foi dissolvido em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e, em seguida, diluído em 9,0 mL de meio padrão RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; Sigma, Brasil). As concentrações testadas do OEB variaram de 0,0488 a 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. As equinocadinas e Anfotericina B foram utilizados como antifúngicos de referência nas concentrações de 0,03 a 16,0 e 0,015-8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Todas as soluções de estoque foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

Para a obtenção de um inóculo de levedura de 1,0 a 5,0 x 10⁶ UFC.mL⁻¹, cada isolado foi cultivado em um tubo contendo 20 mL de 4% de ágar dextrose Sabouraud (SDA; Difco) e extrato de levedura a 35 °C durante 24 horas para *Candida* e 48 horas *Cryptococcus*. Depois disso, as suspensões de leveduras foram transferidas para uma solução fisiológica esterilizada (0,85%), mantidas a 28 ± 2 °C e ajustado para 90% de transmitância a 530 nm. Para a obtenção de um inóculo final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC.mL⁻¹ duas diluições seriadas de 1:100 e 1:20 foram realizadas.

Os dermatófitos foram cultivados em tubos de cultura contendo 20 ml de ágar dextrose de batata (PDA, Disco) a 35 °C durante quatro dias. Após este período, as colônias de fungos foram transferidas para tubos contendo 1 mL de solução fisiológica esterilizada (0,85%) e Tween 20 e agitadas suavemente. O sobrenadante foi agitado

em vórtex e a transmitância foi ajustada para 65-70% a 530 nm. Para a obtenção de um inóculo final de $0,4 - 5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ uma diluição de 1:50 foi realizada.

Os testes de susceptibilidade fúngica ao OEB foram realizados em microplacas por meio da diluição seriada de 100 uL do OEB em dez poços consecutivos contendo 100 uL de meio padrão RPMI 1640 (pH 7,0; 0,165 M de MOPS) e 100 uL do inóculo. Os antifúngicos caspofungina, anidulafungina, micafungina e Anfotericina B foram utilizados como drogas de referência. Após as diluições, as microplacas foram incubadas a 35 °C em incubadora de CO₂ e a avaliação visual foi feita após 48 horas para os isolados de *Candida* e 72 horas para os isolados de *Cryptococcus*.

A CIM correspondeu à concentração mais baixa da droga capaz de provocar 50% de inibição no crescimento dos inóculos para os poços contendo OEB, caspofungina, micafungina e anidulafungina. Para a Anfotericina B a CIM está relacionado à 100% de inibição de crescimento do inóculo. Todos os testes foram realizados em triplicado e os valores de CIM foram expressos como média aritmética.

3. Resultados e Discussão

Neste estudo foi testada a atividade antifúngica do OEB contra as mais incidentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) e também contra *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*). O Quadro 1 apresenta os valores da CIM do OEB para as espécies testadas.

QUADRO 1. COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS EQUINOCADINAS E ANFOTERICINA B EM RELAÇÃO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* (OEB) CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS* OBTIDOS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA E NEUROCRÍPTOCOCCOSE, RESPECTIVAMENTE, EM HOSPITAL PÚBLICO DO RECIFE, BRASIL, ENTRE JULHO DE 2012 E JUNHO DE 2013, E CONTRA DERMATÓFITOS OBTIDOS DE PACIENTES COM DERMATOFITOSE CUTÂNEA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS, UFPE, BRASIL, ENTRE ABRIL E JUNHO DE 2013.

Micro-organismo	Linhagem ou número do paciente	Valores da CIM ¹ para os antifúngicos e o óleo essencial de <i>E. brejoensis</i> (OEB)				
		Caspofungina	Anidulafungina	Micafungina	OEB	Anf B ²
<i>Candida albicans</i>	82	0,5	4	0,06	0,390625	1
<i>C. albicans</i>	6081	0,06	0,5	0,03	1,5625	0,25
<i>C. albicans</i>	4451	0,03	0,5	0,03	3,125	0,5
<i>C. albicans</i>	8299	0,125	0,25	0,015	3,125	1
<i>C. albicans</i>	9925	0,125	0,25	0,015	3,125	1
<i>C. albicans</i>	5623	0,06	0,5	0,03	3,125	0,25
<i>C. glabrata</i>	8340	0,25	0,25	0,015	6,25	0,5
<i>C. krusei</i>	14206	0,125	0,25	0,015	6,25	0,5
<i>C. tropicalis</i>	4584	0,06	0,125	0,015	3,125	1
<i>C. tropicalis</i>	7866	0,125	0,25	0,015	3,125	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	3521	0,06	2	0,03	6,25	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	5283	0,25	8	0,06	6,25	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	6085	0,25	8	0,06	6,25	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	7398	0,5	2	0,06	6,25	1
<i>C. parapsilosis</i>	7736	0,5	4	0,125	6,25	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	9968	0,25	4	0,125	6,25	1
<i>C. parapsilosis</i>	13531	0,25	4	0,125	6,25	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC ³ 22019	0,5	1	0,5	6,25	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	URM ⁴ 6895	G ⁵	G	G	3,125	0,5
<i>C. neoformans</i>	URM 6901	G	G	G	3,125	0,25
<i>C. neoformans</i>	URM 6907	G	G	G	3,125	0,125
<i>C. neoformans</i>	URM 6909	G	G	G	3,125	0,125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	URM 5432	0,5	1	0,03	6,25	16
<i>T. rubrum</i>	URM 5413	0,5	0,5	0,06	12,5	16
<i>Microsporum canis</i>	URM 6241	0,5	0,5	0,06	12,5	4
<i>M. gypseum</i>	URM 6199	0,5	0,5	0,06	12,5	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	URM 6209	1	1	0,06	12,5	1

¹CIM – Concentração Inibitória Mínima. Os valores da CIM estão em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a caspofungina, anidulafungina, micafungina e anfotericina B; e em $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *E. brejoensis*.

²Anf B - Anfotericina B

³ATCC - *American Typical Culture Collection*

⁴URM – Coleção de Cultura URM /UFPE/Brasil

⁵G – Crescimento na maior concentração testada

Numerosos estudos já reportaram a atividade antifúngica de óleos essenciais, sendo a eficiência de inibição variável em relação à espécie fúngica e ao tipo de óleo essencial testados (NYEGUE et al., 2014; PINTO et al., 2014; RATH; MOHAPATRA, 2015).

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais é relacionado ao sinergismo existente entre os vários componentes presentes nos mesmos (PINTO et al., 2006; YAHYAZADEH et al., 2008). Estes componentes agem, sobretudo, nas membranas celulares e são capazes de alterar a permeabilidade das mesmas (BAKKALI et al., 2008). Especialmente em espécies de *Candida*, o mecanismo de ação dos óleos essenciais é por meio da inibição da fase S do ciclo celular (PINTO et al., 2013).

Entre todos os micro-organismos testados, as espécies de *Candida* apresentaram os resultados mais promissores, uma vez que os valores da CIM foram os mais baixos (0,39 a 6,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). A menor CIM do OEB (0,39 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) é três vezes menor do que o menor valor da CIM reportado previamente (1,25 – 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) do óleo essencial de *Thymus caespititius* para espécies de *Candida* de interesse médico (PINTO et al., 2014). Os óleos essenciais de espécies de *Thymus* são considerados agentes antifúngicos potentes (FLORES; BECK; DA SILVA, 2015). Além disso, a CIM para as espécies de *Candida*, no presente estudo, estão em conformidade com os apresentados por eugenol e estragol puros (FONTENELLE et al., 2011). Vale salientar, que o eugenol e o estragol são considerados os componentes de óleo essencial com a maior atividade antimicrobiana existente, uma vez que os mesmos possuem grupamento hidroxil de natureza ácida que degrada o sítio ativo de algumas importantes enzimas antimicrobianas (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

As espécies de *C. neoformans* testadas não são inibidas pelas Equinocadinas mesmo na mais alta concentração da droga testada (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), no entanto, o OEB na concentração de 3,12 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ foi capaz de provocar a inibição de 50% no crescimento dos inóculos testados.

Em relação às espécies de dermatófitos avaliadas, os seguintes valores de CIM foram encontrados: 6,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para *T. mentagrophytes* e 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para *T. rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*. Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores (FLORES; BECK; DA SILVA, 2015; MAHBOUBI; KAZEMPOUR, 2015). Ainda, o valor da CIM para o *T. mentagrophytes* foi 2,56 menores do que o apresentado pela droga utilizada como controle, Anfotericina B.

Destarte, os resultados apresentados mostram que o OEB é um biocomposto que, após avaliadas as condições de segurança, poderá ser utilizado no desenvolvimento de uma formulação para o tratamento de candidíase e onicomicose.

4. Conclusões

Este estudo descreve, pela primeira vez, a atividade antifúngica do OEB. Nossos resultados demonstram que o OEB tem atividade contra algumas espécies de leveduras e dermatófitos que estão associadas com infecções em humanos. Entretanto, estudos posteriores são necessários a fim de desenvolver um sistema apropriado para a encapsulação do OEB com a finalidade de melhorar a solubilidade e assim aumentar a sua atividade antifúngica. Além disso, a encapsulação do OEB o tornará mais estável às condições adversas durante o processamento e armazenagem do mesmo e a sua utilização na indústria farmacêutica será mais plausível.

5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), fornecido através do Edital Universal MCTI/CNPq 14/2014 (processo 455745/2014-5).

6. Referências

ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. e51–e56, jun. 2014.

- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2000.
- BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.
- BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 11, p. 895–907, 2011.
- CETIN, B. et al. Chemical Composition of Hydrodistilled Essential Oil of *Artemisia incana* (L.) Dr uce and Antimicrobial Activity against Foodborne Microorganisms. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 2302–2310, 2009.
- DA SILVA, A. G. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441–1447, 2 nov. 2015.
- FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; DA SILVA, C. DE B. Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, 19 out. 2015.
- FONTENELLE et al. Alkylphenol activity against *Candida* spp and *Microsporum canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-methyl derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 6422–6431, 2011.
- HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, p. 2–15, 2008.
- HAY, R. J. Fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 201–2012, 2006.
- HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraal b ed. Utrecht/Reus, Netherland: [s.n.].
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antimicrobial and antifungal properties of essential oils. **Curr. Med. Chem.**, v. 10, p. 813–829, 2003.
- LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515–522, jun. 2014.
- LYON, G. M. et al. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1270–1275, 2010.
- MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential

oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. **Journal de mycologie médicale**, v. 25, n. 2, p. e65–71, jun. 2015.

NYEGUE, M. A. et al. CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF EUGENIA CARYOPHYLLA AND MENTHA SP CF PIPERITA AND THEIR IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITIES ON SIX HUMAN PATHOGENIC FUNGI. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 11, n. 6, p. 40–46, 2014.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 2, n. 4, p. 259–269, 8 ago. 1999.

PFALLER, M. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 323–331, 2012.

PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65–69, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1367–73, 2006.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 11, p. 1454–1462, 2009.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 1311–20, 2013.

PINTO, E. et al. Activity of *Thymus caespititius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 107–112, 2014.

RATH, C. C.; MOHAPATRA, S. Susceptibility characterisation of *Candida* spp. to four

- essential oils. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 93–96, 2015.
- SABIITI, W.; MAY, R. C. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35455, jan. 2012.
- SHERF, A. F. A method for maintaining *Phytophthora* *sepedonica* for long periods without transference. **Phytopathology**, v. 3, p. 30–32, 1943.
- SILVA, F. et al. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 42–7, 15 dez. 2011.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.
- TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal Investigations On Plant Essential Oils. A Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 19–28, 2013.
- VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. et al. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 11, n. 5, p. 381–93; quiz 394, maio 2013.
- YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 24, p. 1445–50, 2008.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95–105, 2014.
- ZABKA, M.; PAVELA, R.; PROKINOVA, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443–448, 2014.
- ZORE, G. B. et al. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e99–109, 2011.
- ZUZARTE, M. et al. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 1505–1510, 2012.

CAPÍTULO 2

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis* COM β -CICLODEXTRINA

Artigo a ser submetido à revista Industrial Crops and Products (ISSN 0926-6690)

Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* com β -ciclodextrina

Nataly Amorim de Santana ^{1,2,*}, Rayane Cristine Santos da Silva ^{1,3}, Daniela Maria do Amaral Ferraz e Navarro ³, Márcia Vanusa da Silva ⁴ e Giovanna Machado ²

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

2 Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz freire, 01. Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50.740-540.

3 Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

4 Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

*Autor para correspondência. Número Fax: +55 81 3334 7200

E-mail: nataly.amorim@gmail.com

Resumo:

Diversos óleos essenciais extraídos de plantas apresentam significantes atividades biológicas. Entretanto, a baixa solubilidade em água, fácil oxidação e alta volatilidade são fatores que limitam a sua aplicação em muitos produtos e tecnologias industriais. Assim, a estratégia de formação do complexo de inclusão com ciclodextrinas e o óleo essencial tem sido amplamente utilizada para melhorar a solubilidade e evitar a degradação do óleo. Neste estudo, o óleo essencial obtido de folhas de *Eugenia brejoensis* (OEB) foi usado para preparar o complexo de inclusão sólido com β -ciclodextrina (BCD). A formação do complexo de inclusão do OEB e BCD foi investigada por calorimetria exploratória diferencial (DSC), análises de termogravimetria (ATG) e difração de raios X (DRX). Além disso, o estudo da liberação do biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e espatulenol, no complexo de inclusão foi realizado por análises de *headspace* estático acoplado a cromatografia gasosa (HE-GC). Os resultados obtidos confirmam a formação do complexo de inclusão de OEB e BCD na proporção molar de 1:1 e mostram que o percentual de retenção do OEB pela BCD foi de 86,87%.

Palavras-chave: óleo essencial; *Eugenia brejoensis*; β -ciclodextrina.

1. Introdução

Os óleos essenciais provenientes de algumas espécies de plantas da família Myrtaceae apresentam significativas atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória, antimutagênica, antioxidante e antiprotozoários (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; RODRIGUES et al., 2013; ZABKA; PAVELA; PROKINOVA, 2014). Tais atividades biológicas são atribuídas a diversidade química dos componentes dos óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011), que em espécies de *Eugenia* há uma predominância de sesquiterpenos e monoterpenos. (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A baixa solubilidade em água, fácil oxidação e alta volatilidade são fatores que limitam a aplicação do óleo essencial em muitos produtos e tecnologias industriais (MARQUES, 2010). Portanto, a estratégia de fazer complexos moleculares com ciclodextrinas e óleos essenciais é uma alternativa para melhorar a solubilidade e evitar a degradação do óleo (BILIA et al., 2014).

Existem três principais tipos de ciclodextrinas: α -, β - e γ -ciclodextrinas. β -ciclodextrinas (BCD) é uma das mais utilizadas devido às dimensões da sua cavidade interna (0.5-0.8 nm) (D. DUCHÊNE; G. PONCHEL, 1999). BCD é um oligossacarídeo cíclico formado por sete unidades de glucopiranosose ligadas por ligações α -(1,4) e que possui a cavidade interna hidrofóbica e a interna hidrofílica (SZENTE, L., & SZEJTLI, 2004). Muitos trabalhos já foram publicados reportando a complexação de BCD com óleos essenciais brutos ou com alguns componentes purificados visando diferentes propósitos (ABARCA et al., 2016; HĂDĂRUGĂ et al., 2014; SANTOS et al., 2015; XI et al., 2015).

Na formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e moléculas hidrofóbicas, estão envolvidas ligações reversíveis e que ocorrem através de ligações não covalente como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (JIANG et al., 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a complexação do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae), popularmente conhecida como cutia, uma espécie arbustiva localizada nas regiões nordeste e sudeste do Brasil (GIARETTA; PEIXOTO, 2014; MAZINE; SOUZA, 2008) e determinar a capacidade de retenção da BCD e o seu potencial de ligação à componentes voláteis individuais (biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e espatulenol) do OEB.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

As folhas de *E. brejoensis* usadas neste trabalho foram coletadas no mês de março de 2014 no Parque Nacional do Catimbau, Buíque/PE - Brasil (8° 30' 57" S, 37° 20' 59" O). Uma amostra da espécie foi depositada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Brasil, sob o número IPA 84.033. A β -ciclodextrina (BCD) foi adquirida da Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas de *E. brejoensis* foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram coletadas 342 g de folhas de *E. brejoensis*. Em seguida, as folhas foram picadas e submetidas à hidrodestilação durante 4 horas em aparelho tipo Clevenger.

2.2.2 Análise da composição química do óleo de *E. brejoensis* por GC-MS

A análise de GC-MS foi realizada no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Os compostos voláteis foram analisados através de cromatografia gasosa/ espectrometria de massa (CG/EM) em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μ m espessura da película). Para a análise, 1 μ L de uma solução de 2000 ppm do óleo essencial dissolvido em hexano, foi injetado em modo split 1:20.

Posteriormente injetou-se 1µL em split (1:20) da mistura de padrões de hidrocarbonetos (C9-C34). Posteriormente, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1µL (0.2µL de alcanos e 0.8µL de óleo) em splitless. A solução hexânica de hidrocarboneto foi preparada com padrões comerciais Sigma-Aldrich®. A temperatura do CG foi ajustada em 60 °C por 3 min, aumentada em 2,5 °C min⁻¹, até 240 °C e mantida por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo IE) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan-s de m/z 20-350. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção com aqueles de padrões autênticos disponíveis na biblioteca de referência MassFinfer 4, NIST 08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity do Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada campo.

A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool and Kratz (1963) e comparado com dados da literatura (Adams, 2009).

2.2.3 Preparação do complexo de inclusão do óleo de *E. brejoensis* e β-ciclodextrina

O complexo de inclusão do óleo de *E. brejoensis* e β-ciclodextrina (OEBCD) foi preparado de acordo com o método previamente descrito (MENEZES et al., 2014), com algumas modificações. A proporção molar de BCD e OEB foi de 1:1. Primeiramente, a BCD foi solubilizada em 10 mL de água Mill-Q®. Em seguida, o OEB foi adicionado e mantido sob agitação magnética a 300 rpm e 25 °C durante 30 h. Depois deste período, esta solução foi liofilizada a - 45 °C e 0 Pa em liofilizador modelo Enterprize II (Terroni – São Carlos, Brazil) durante 48h.

2.2.4 Preparação da mistura física do óleo de *E. brejoensis* e β-ciclodextrina

A mistura física (MF) foi preparada pela adição de OEB a um almofariz contendo a BCD em pó e submetida a agitação manual. A proporção molar do OEB e da BCD foi a mesma descrita na preparação do complexo de inclusão. Em seguida, a MF foi armazenada em recipiente de vidro e mantida em dessecador.

2.2.5 Caracterizações do complexo de inclusão do óleo de *E. brejoensis* e β -ciclodextrina

2.2.5.1 Análises térmicas

Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análises de termogravimetria (ATG) foram realizadas em analisador térmico simultâneo (NETZSCH STA 449 F3 Jupiter). Cerca de 2 mg da amostra foi colocada em cadinho de alumínio e submetida a faixa de temperatura de 40 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

2.2.5.2 Difração de raios X

Os padrões de raios X das amostras analisadas foram obtidos em difratômetro Bruker D8 Advance (Alemanha) (30 kV, 30 mA) equipado com radiação $\text{CuK}\alpha$ e comprimento de onda 0,154 nm. As medidas foram feitas variando o intervalo angular entre 3 - 65 °C (2 θ).

2.2.6 Headspace estático acoplado a cromatografia de fase gasosa

Para estudar a liberação dos compostos voláteis do OEB quando complexados com BCD, foi utilizada a técnica de HE-GC. Para esta análise, uma solução aquosa de 5 mL a 500 ppm foi preparada utilizando-se o OEB puro como controle e o OEBCD. As soluções foram colocadas em frascos específicos para *headspace* de 22 mL, os quais foram vedados. Após 30 min, o equilíbrio entre a fase gasosa e a fase aquosa foi estabelecido e 1 mL dos vapores, presentes acima da fase aquosa, foi retirado do frasco utilizando-se uma seringa para gases e a amostra foi injetada no cromatógrafo para análise. As condições de medida foram as mesmas descritas para GC-MS.

2.2.6.1 Determinação do percentual de retenção do óleo de *E. brejoensis* pela β -ciclodextrina

O percentual de retenção {r(%)} do OEB pela BCD foi determinada pela análise de HE-GC com as amostras incubadas à 30 °C, segundo a fórmula abaixo descrita previamente (KFOURY et al., 2015):

$$r(\%) = \left(1 - \frac{\sum ACD}{\sum A0}\right) \times 100 \quad (1)$$

Onde $\sum A0$ e $\sum ACD$ representam a soma das áreas dos picos na ausência e na presença de BCD, respectivamente. As medidas foram feitas em triplicata.

2.2.6.2 Estudos de liberação

O estudo de liberação dos componentes do OEB foi feito utilizando o método de extração múltipla de *headspace* (EMH) (KOLB; ETTRE, 2006). As amostras foram mantidas a 60 °C e quatro sucessivas extrações foram feitas a cada intervalo de 60 min. A cada extração, 1 mL da amostra era retirada do frasco e a quantidade de cada componente presente no OEB na fase gasosa foi determinado por análise de CG. O percentual remanescente de cada componente do OEB livre ou complexado foi determinado usando a seguinte equação previamente descrita (KFOURY et al., 2015):

$$\text{Componentes remanescentes do óleo (\%)} = \left(\frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

Onde A_t e A_0 correspondem a área do pico de cada componente do OEB no tempo t e no tempo 0. As medidas foram feitas em triplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição do óleo essencial de *E. brejoensis*

A extração do OEB obteve um rendimento de 0,010% (p/p). Um total de cinquenta componentes, que representam 99,32% do óleo total, foram identificados

(Tabela 1). Os hidrocarbonetos sesquiterpenos são os componentes mais presentes (63,83%) no óleo. Os componentes majoritários do OEB são o biciclogermacreno (17,87%), δ -cadineno (14,31%), β -cariofileno (11,44%), α -cadinol (7,24%) e muurolol <epi- α -> (6,66%). Nossos resultados são muito similares à identificação dos constituintes do OEB reportada previamente (DA SILVA et al., 2015). Entretanto, o presente estudo foi capaz de identificar mais nove componentes voláteis. Esses novos achados podem ser explicados pelas mudanças sazonais do clima e solo, que são capazes de mudar a composição do óleo essencial quantitativamente e qualitativamente (ANGIONI et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MASOTTI et al., 2003).

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DE FOLHAS DE *E. brejoensis*.

Número	Componente identificado ^a	IR Obtido ^b	IR Referência ^c	Teor (% do óleo total)
1	Bicicloelemeno	1339	1335	0,63
2	α -Cubebeno	1351	1345	0,15
3	α -Copaeno	1377	1374	0,50
4	β -Bourboneno	1387	1387	0,50
5	β -Elemeno	1393	1389	1,56
6	α -Gurjuneno	1412	1409	2,46
7	β -(E)-Cariofileno	1421	1417	11,44
8	β -Copaeno	1431	1430	0,16
9	Aromadendreno	1441	1439	0,73
10	<i>cis</i> -Muurola-3,5-dieno	1448	1448	0,14
11	<i>trans</i> -Muurola-3,5-dieno	1452	1451	0,34
12	α -Humuleno	1455	1452	1,39
13	Cariofileno <9-epi-(E)->	1463	1464	1,81
15	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	1475	1475	0,55
17	Germacreno D	1483	1485	1,13

21	<i>trans</i> -Muurola- 4(14),5-dieno	1494	1493	0,61
22	Biciclogermacreno	1499	1500	17,87
23	α -Muuroleno	1502	1500	2,98
24	Germacreno A	1507	1508	0,16
26	γ -Cadineno	1516	1513	3,81
28	δ -Cadineno	1526	1522	14,31
29	<i>Trans</i> -Cadina-1,4- dieno	1535	1533	0,40
30	α -Cadineno	1540	1537	0,69
31	α -Calacoreno	1545	1544	0,10
33	Palustrol	1570	1567	0,56
35	Espatulanol	1580	1577	2,32
38	Guaiol	1600	1600	2,01
41	Cubenol<1,10-di- epi->	1618	1618	0,39
42	Cubenol<1-epi->	1631	1627	0,69
44	Muurolol <epi- α ->	1645	1640	6,66
45	α -Muurolol	1649	1644	1,16
47	α -Cadinol	1657	1652	7,24
48	Bulnesol	1670	1670	0,20
50	Shyobunol	1694	1688	5,73
HS				63,83
SO				26,96
NI				8,53
Total				99,32

^aConstituintes listados em ordem de eluição na coluna não-polar DB-5; Índices de Retenção (IR) cauculados a partir do tempo de retenção em relação aqueles da série C9-C30 n-alcanos em uma coluna de capilaridade 30 m DB-5; Valores obtidos de Adams, 2007. HS = Hidrocarbonetos Sesquiterpenos; SO =Sesquiterpenos Oxigenados; NI=Componentes não-identificados.

Além disso, a identificação química também está em consonância com a composição de óleos essenciais extraído de outras espécies do gênero *Eugenia* (APEL et al., 2005; COLE; HABER; SETZER, 2007; COLE et al., 2007; DUARTE et al., 2009; FISCHER et al., 2005), que geralmente são compostos por sesquiterpenos

cíclicos e monoterpenos. Somente poucas espécies do gênero *Eugenia* produzem componentes alifáticos e aromáticos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). O sesquiterpeno β -cariofileno é frequentemente encontrado como o maior constituinte de óleos essenciais de folhas de várias espécies de *Eugenia* (SOUSA et al., 2015; VICTORIA et al., 2012).

3.2 Caracterização do complexo de inclusão do óleo de *E. brejoensis* e β -ciclodextrina

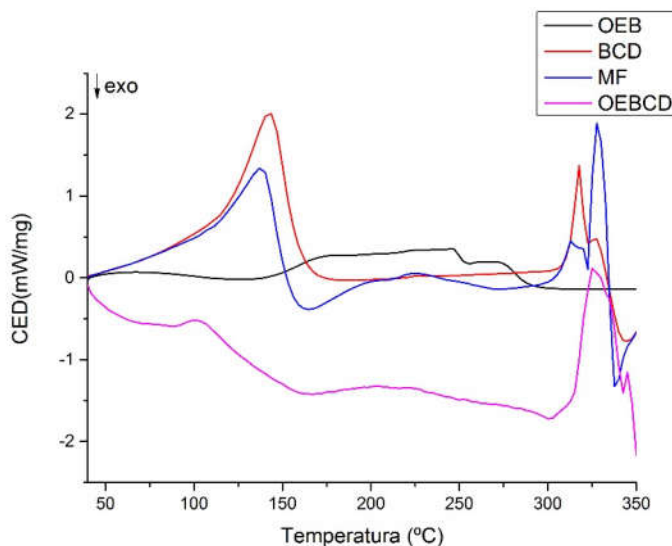
3.2.1 Análises de DSC

A DSC é o método mais utilizado para a identificação e comprovação de complexos de inclusão com ciclodextrinas. Por meio desta análise é possível visualizar uma modificação no padrão térmico das ciclodextrinas, que ocorre após a ligação da molécula hidrofóbica na cavidade interna da mesma (MURA, 2015).

Nos resultados obtidos pode-se observar a ocorrência de dois picos endotérmicos bem definidos na curva de DSC da BCD, um relacionado a sua desidratação (aproximadamente em 140 °C) e o outro correspondente à sua decomposição (aproximadamente a 318 °C).

A curva de DSC do OEB apresentou pico endotérmico em cerca de 243 °C, que desaparece no termograma do OEBCD. Este fato pode ser explicado pela encapsulação do OEB na BCD que é capaz de aumentar a estabilidade do óleo. Por fim, o padrão encontrado na curva de DSC da MF é semelhante com a curva de DSC da BCD livre, indicando pouca ou nenhuma interação do OEB e a BCD. Os resultados são apresentados na Figura 1 e estão compatíveis com os dados encontrados na literatura (XI et al., 2015).

FIGURA 1. CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis* (OEB), β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD) EM ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (50 mL/min) E TAXA DE AQUECIMENTO DE 10 °C/min.



3.2.2 Análises Termogravimétricas

As curvas das análises de termogravimetria (TG) para as amostras analisadas podem ser visualizadas na Figura 2. O OEB mostrou decomposição gradativa acentuada entre 157°C e 298°C, com uma perda de massa equivalente a 85,57% do total da amostra. Nesta mesma faixa de temperatura (157 - 298°C) a perda de massa para o OEBCD foi de apenas 0,95%.

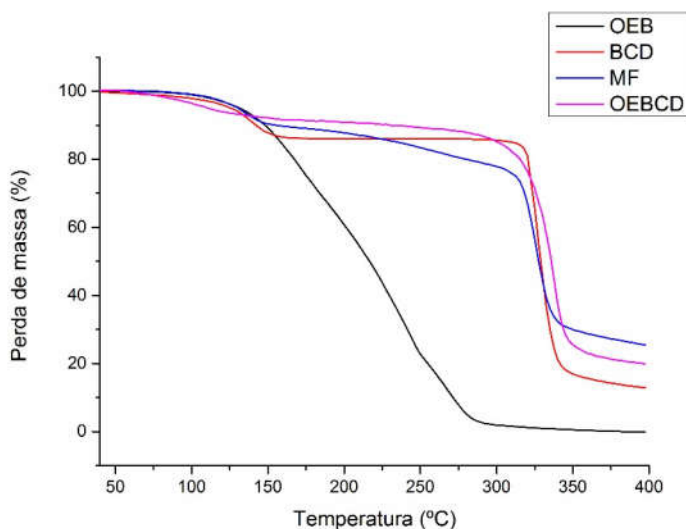
A amostra de BCD livre mostra um perfil termodinâmico que pode ser dividido em quatro fases. A primeira fase envolve a perda de água (13,69%) de 37 – 150°C. Em seguida, entre 165 e 270°C, a curva de ATG é plana e nenhuma perda de massa é detectada e a decomposição termal (30,74%) ocorre depois dos 270°C, com máxima temperatura de decomposição aos 327°C.

A curva de ATG do OEBCD mostrou a sobreposição do comportamento termal da BCD e do OEB. Até a temperatura de decomposição do OEB livre (236 °C), o OEBCD tem uma perda de massa de 18,59%, que pode ser atribuída tanto à perda de água quanto a liberação de pequena quantidade de óleo. Já a MF mostrou comportamento semelhante ao da BCD livre e houve uma perda de massa de 16,44%

até 236°C. Assim, conclui-se que para as amostras contendo a BCD a decomposição maior começou acima de 270°C. Na formação do complexo molecular, as moléculas de água na cavidade hidrofóbica são substituídas pelas moléculas do óleo essencial que se ligam por meio de ligações não-covalentes e deste modo, ficam protegidas da degradação (BILIA et al., 2014).

Esses resultados em combinação com as análises de DSC corroboram a formação do complexo de inclusão entre o OEB e a BCD e indicam que o OEB está complexado na BCD, uma vez que, na encapsulação moléculas de água são substituídas pela molécula convidada (MURA, 2015)

FIGURA 2. CURVAS DE TERMOGRAVIMETRIA (TG) DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis* (OEB), β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD) EM ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (50 mL/min) E TAXA DE AQUECIMENTO DE 10 °C/min.

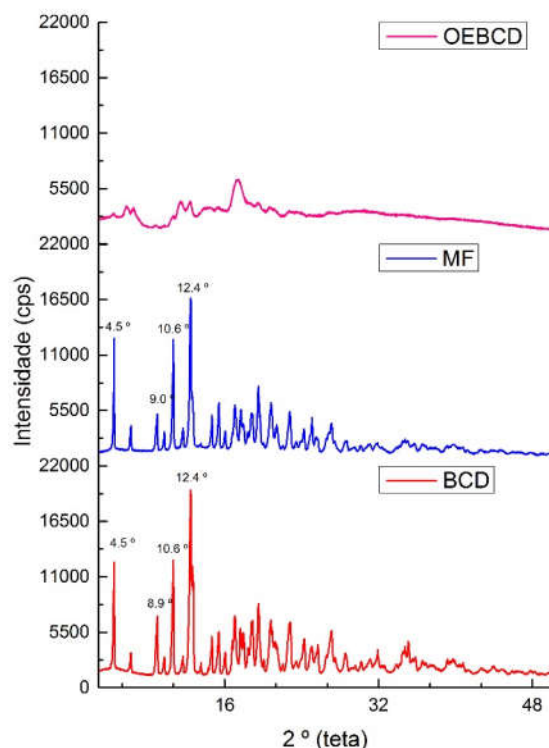


3.2.3 Difração de Raios X

DRX é uma técnica bastante útil para a caracterização de ciclodextrinas e seus complexos de inclusão (GALVÃO et al., 2015; MURA, 2015). Quando uma nova fase sólida é formada, em virtude da constituição do complexo de inclusão, são observadas mudanças na intensidade ou na posição de alguns picos característicos das amostras de ciclodextrinas (MURA, 2015). Os padrões de DRX para a BCD livre, a MF e o OEBCD estão apresentados na Figura 3. Como pode ser observado, a BCD livre é

uma amostra cristalina cujo padrão de difração apresenta numerosos picos característicos ($4,5^\circ$, $8,9^\circ$, $10,6^\circ$, $12,4^\circ$). O padrão de difração da MF é muito similar ao da BCD, mostrando que não existe nenhuma interação entre o OEB e a BCD. Já o padrão de difração do OEBCD mostra amorfização. Esta mudança de padrão é atribuída a formação do complexo de inclusão (ABARCA et al., 2016; MENEZES et al., 2014).

FIGURA 3. PADRÃO DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE β -CICLODEXTRINA (BCD), MISTURA FÍSICA (MF) E COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE OEB E BCD (OEBCD).



3.3 Headspace estático acoplado a cromatografia de fase gasosa

3.3.1 Determinação do percentual de retenção do OEB pela BCD

O percentual de retenção do OEB pela BCD foi de 86,87%. Este percentual foi calculado pela diferença entre a soma das áreas dos picos do cromatograma dos componentes do OEB na presença de BCD menos a soma das áreas dos picos do

cromatograma dos componentes do OEB na ausência de BCD, como mostrado na Equação 1. Kfoury et al. estudou a complexação entre nove diferentes óleos essenciais e BCD e mostrou um percentual de retenção entre 27 – 87% (KFOURY et al., 2015). Esses resultados mostram que a BCD pode reter eficientemente o OEB.

3.3.2 Estudos de liberação

Para os estudos de liberação foram selecionados quatro componentes do OEB, são eles: biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e espatulenol. Após alcançado o equilíbrio entre as fases aquosas e gasosas do OEBCD, foram feitas extrações a cada 60 min de intervalo. O percentual remanescente de cada componente volátil selecionado encontrado no OEB foi determinado baseando-se nas suas áreas individuais dos picos cromatográficos utilizando a Equação 2. Como observado na Tabela 2, as áreas dos picos dos componentes do OEB estudados diminuíram na presença de BCD. Este fato pode ser explicado pela diminuição da volatilidade dos componentes que ocorre devido a formação do complexo molecular (FOURMENTIN et al., 2013; KFOURY et al., 2014). A maior percentagem de liberação no OEBCD ocorreu entre 60 e 120 minutos (Tabela 2). Isto pode ser explicado pela interação da BCD por cada componente causando uma retenção inicial com subsequente liberação, como observado para β -cariofileno, biciclogermacreno e δ -cadineno. Em contrapartida, o OEB livre é observado uma diminuição contínua das concentrações dos componentes em relação ao tempo (Tabela 3), já que não existe a retenção pela BCD. Este resultado demonstra que a BCD promove a retenção do OEB, permite a liberação gradual do mesmo e, poderá assim, prolongar a sua bioatividade.

TABELA 2. MÉDIA DAS ÁREAS REAIS DOS PICOS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis* (β -CARIOFILENO, BICICLOGERMACRENO, δ -CADINENO E ESPATULENOL) QUANDO COMPLEXADOS NA β -CICLODEXTRINA.

Tempo (min.)	Área real			
	β - cariofileno	Biciclogermacreno	δ - cadineno	Espatulenol
0	33948519	7283099	59459540	70938820
60	36117430	9316780	72087550	66598937
120	38617707	8055162	79746038	66334567
180	21239713	5178478	58229885	54027204

TABELA 3. MÉDIA DAS ÁREAS REAIS DOS PICOS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis* (β -CARIOFILENO, BICICLOGERMACRENO, δ -CADINENO E ESPATULENOL) NO ÓLEO LIVRE.

Tempo (min.)	Área real			
	β - cariofileno	Biciclogermacreno	δ - cadineno	Espatuleno
0	3202519378	2778904202	2969085826	386725039
60	3156944483	2556300954	2720912699	316013871
120	3056022815	2290445190	2511674164	285030783
180	3018403482	2115276174	2420204594	289076979

4. Conclusões

Este trabalho possibilitou a identificação química de novos componentes do óleo essencial obtido de folhas de *E. brejoensis*, como também, mostrou, a partir de análises térmicas e DRX, a formação do complexo de inclusão sólido entre o OEB e BCD. Analisando os resultados obtidos por DSC é possível inferir uma maior estabilidade do OEB após a complexação com BCD em comparação com o OEB livre. Além disso, a habilidade da BCD de reter o OEB e reduzir a sua volatilidade foi demonstrado pela extração múltipla de *headspace*. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar as propriedades biológicas e toxicidade do complexo de inclusão entre OEB e BCD.

5. Agradecimentos:

Os autores gostariam de agradecer ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Os autores também agradecem ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo suporte analítico e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização de coleta.

6. Referências

- ABARCA, R. L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complex containing an essential oil component. **Food Chem**, v. 196, p. 968–975, 2016.
- ANGIONI, A. et al. Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. **J. Agric. Food Chem**, 2006.
- APEL, M. A. et al. Volatile Constituents of *Eugenia mattosii* Legr (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 3, p. 284–285, 2005.
- BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2014, p. 651593, 29 maio 2014.
- COLE, R. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. **J Nat Med**, v. 61, n. 4, p. 414–417, 2007.
- COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.
- D. DUCHÊNE, D. W.; G. PONCHEL. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 1-2, p. 263–268, 1999.
- DA SILVA, A. G. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441–1447, 2 nov. 2015.
- DUARTE, A. R. et al. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **J Braz Chem Soc**, v. 20, p. 967–974, 2009.
- FISCHER, D. C. H. et al. Essential Oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil . **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 5, 2005.
- FOURMENTIN, S. et al. Space filling of beta-cyclodextrin and beta-cyclodextrin derivatives by volatile hydrophobic guests. **beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 1185–1191, 2013.
- GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 20 maio 2015.

- GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. New records of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) and complementary description. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1176–1178, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. lantais medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- HĂDĂRUGĂ, D. I. et al. Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. essential oil/ β -cyclodextrin supramolecular system. **beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 2809–2820, 2014.
- JIANG, H. et al. NMR Investigations of Inclusion Complexes between β -Cyclodextrin and Naphthalene/Anthraquinone Derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 133–138, 29 ago. 2006.
- KFOURY, M. et al. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chem**, v. 164, p. 454–461, 2014.
- KFOURY, M. et al. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 264–272, out. 2015.
- KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Static headspace-gas chromatography: Theory and practice**. second ed. [s.l: s.n.].
- MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313–326, 2010.
- MASOTTI, V. et al. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. 2003.
- MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 4, p. 775–777, 2008.
- MENEZES, P. P. et al. Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2429–2437, 2014.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 226–38, 10 set. 2015.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- RODRIGUES, K. A. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-

- Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 279726, 2013.
- SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583–592, 2015.
- SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71–78, 2015.
- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73–94, 2011.
- SZENTE, L., & SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 137–142, 2004.
- TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.
- XI, J. et al. Preparation, Characterization and Pharmacokinetic Study of Xiangfu Siwu Decoction Essential Oil/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Molecules**, v. 20, p. 10705–10720, 2015.
- ZABKA, M.; PAVELA, R.; PROKINOVA, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443–448, 2014.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia brejoensis*

Artigo a ser submetido ao Journal of Essential Oil Research (ISSN 1041-2905)

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Eugenia brejoensis*

Nataly Amorim de Santana ^{1,2,*}, Juliano Elvio de Oliveira ³, Márcia Vanusa da Silva ⁴ e Giovanna Machado ²

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP: 50670-420.

2. Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz freire, 01. Cidade universitária, Recife, Brasil, CEP:50740-540.

3. Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil, CEP: 33200-000.

4. Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n° - Cidade Universitária, Recife, Brasil, CEP:50670-420.

*Autor para correspondência. Número Fax: +55 81 3334 7200

E-mail: nataly.amorim@gmail.com

Resumo

O encapsulamento de óleos essenciais oriundos de plantas aromáticas em nanoemulsões é uma estratégia que permite a solubilização em meio aquoso, aumento da estabilidade física e bioatividade, bem como, a diminuição da volatilidade do óleo. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) para a veiculação de óleo essencial de *Eugenia brejoensis* (OEB). Com este propósito, nove formulações foram feitas, utilizando o método da homogeneização, empregando diferentes tempos e velocidades de rotação. Em seguida, as formulações foram investigadas quanto a variações nas características físico-químicas das mesmas tais como, tamanho médio de gota, potencial zeta e estabilidade. Os resultados apresentados mostraram que as nanoemulsões mais estáveis ($143,1 \pm 1,1$ nm; Pdl $0,219 \pm 0,004$; $-19,7 \pm 0,1$ mV) foram obtidas com 12.000

rpm durante 4 minutos. Entretanto, pesquisas futuras são necessárias a fim de comprovar a atividade biológica das nanoemulsões de OEB desenvolvidas.

Palavras-chave: óleo essencial; *Eugenia brejoensis*; nanoemulsão.

1. Introdução

As nanoemulsões são dispersões cineticamente estáveis compostas de óleo, água e agentes surfactantes e que possuem um diâmetro médio de gota entre 20 e 200 nm (RAJALAKSHMI; MAHESH; KUMAR, 2011; YANG; CHO; PARK., 2009). Dependendo das proporções utilizadas dos constituintes, as nanoemulsões podem existir sob diferentes estruturas e fases, tais como: dispersões de óleo em água (O/A), dispersões água em óleo (A/O), dispersões homogêneas trifásicas O/A e A/O e dispersões homogêneas monofásicas O/A e A/O (WINSOR, 1948). Consideradas como um dos mais eficientes nanossistemas utilizados para dispersar nanopartículas, as nanoemulsões são capazes de conferir alta solubilidade a componentes lipofílicos que estejam sendo veiculados pelas mesmas (M.R.MANGALE et al., 2015). Além disso, a possibilidade de utilizá-las sob a forma de cremes, líquidos e sprays em formulações transdérmicas torna a sua aplicabilidade bastante atrativa para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos (V; RAVICHANDRAN V, 2011). Por conseguinte, a otimização das condições de obtenção das nanoemulsões é fundamental para a aplicação tecnológica deste sistema (GUTIÉRREZ et al., 2008; M.R.MANGALE et al., 2015).

A *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae), popularmente conhecida como “cutia”, é uma espécie arbustiva encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (GIARETTA; PEIXOTO, 2014; MAZINE; SOUZA, 2008) e que é utilizada na medicina tradicional no tratamento de diarreias, febre e reumatismo. A baixa solubilidade e a alta volatilidade são alguns fatores que diminuem a bioatividade de óleos essenciais e desse modo, limitam a sua utilização (BILIA et al., 2014). A encapsulação do OEB em nanoemulsões pode ser uma alternativa para melhorar a solubilização do mesmo em meio aquoso, favorecer uma liberação mais prolongada do óleo e quiçá aumentar a sua bioatividade.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão óleo em água (O/A) para veiculação de OEB. Com este propósito, o

efeito da velocidade e do tempo de rotação sobre as características físico-químicas (tamanho médio de gota, potencial zeta e estabilidade) foram investigados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

O polioxietileno 20 mono-oleato de sorbitano (Tween 80) foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil) e usado como surfactante. Todas as emulsões e soluções foram preparadas com água ultrapura.

2.2. Óleo essencial

O óleo essencial das folhas de *E. brejoensis* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os protocolos de extração e identificação química do óleo essencial utilizado neste trabalho já foram previamente descritos (DA SILVA et al., 2015).

2.3. Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões de OEB foram preparadas, com algumas modificações, conforme protocolo previamente descrito (OTONI et al., 2014). Primeiramente, foram adicionados à água ultrapura 2% de OEB (p/v) e 1,5% (p/v) de Tween 80. Em seguida, a solução foi misturada em um equipamento T25 Ultra-Turrax (IKA Werke GmbH & Co, Staufen, Germany) nas velocidades de 4.000, 8.000 ou 12.000 rpm e durante 2, 4 ou 6 minutos a fim de obter diferentes diâmetros de gotas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

2.4. Caracterização das nanoemulsões

Uma hora após o preparo da nanoemulsão foram realizados experimentos de espalhamento de luz dinâmico (ELD) em equipamento Nano Zetasizer Series (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, Reino Unido) para a determinação de distribuição de tamanho, diâmetro médio e índice de polidispersidade (Pdl) das gotas. Água

ultrapura foi utilizada como dispersante para evitar o efeito de espalhamentos múltiplos e interações entre gotas.

3. Resultados e Discussão

O Tween 80, cujo valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) é igual a 15, foi escolhido para ser utilizado como surfactante já que o mesmo é capaz de favorecer a formação de nanoemulsões óleo em água (LAWRENCE; REES, 2000). Nove formulações foram preparadas utilizando diferentes intervalos de tempo (Figura 1) e velocidades de rotação (Figura 2) durante a homogeneização a fim de avaliar a influência desses fatores no diâmetro médio das gotas. O tamanho de gota variou entre 141,9 - 945,5 nm entre as nove formulações desenvolvidas. O aumento da velocidade de rotação foi capaz de reduzir o tamanho das gotas. Este fato ocorre já que o aumento da energia mecânica fornecida por homogeneização acarreta a superação das pressões de Laplace e a consequente redução no tamanho de gota (FERNANDEZ et al., 2004; SAJJADI; ZERFA; W. BROOKS, 2002).

A formulação submetida a velocidade de 12.000 rpm durante 4 min mostrou um perfil monomodal, com o Pdl = $0,219 \pm 0,004$, indicando a presença de uma população cujo tamanho de gota é homogêneo. A alta energia empregada nas preparações também é responsável pelo perfil uniforme do tamanho de partícula apresentado (FERNANDEZ et al., 2004). O diâmetro médio de aproximadamente 143 nm obtido com esta formulação está de acordo com a literatura (BHARGAVA et al., 2015; CHANG; MCLANDSBOROUGH; MCCLEMENTS, 2015; MOGHIMI et al., 2016). Além disso, esta formulação apresentou potencial zeta de $-19,7 \pm 1$ mV mostrando a estabilidade da mesma, já que a obtenção de valores de potencial zeta entre $|\pm 8|$ a $|\pm 33|$ é indicativo de uma formulação estável (MISHRA et al., 2009). Na Tabela 1 são apresentados os experimentos em triplicata realizados para esta formulação.

FIGURA 1. VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (A), ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (B) E POTENCIAL ZETA (C) EM RELAÇÃO AO TEMPO DE HOMOGENEIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis*.

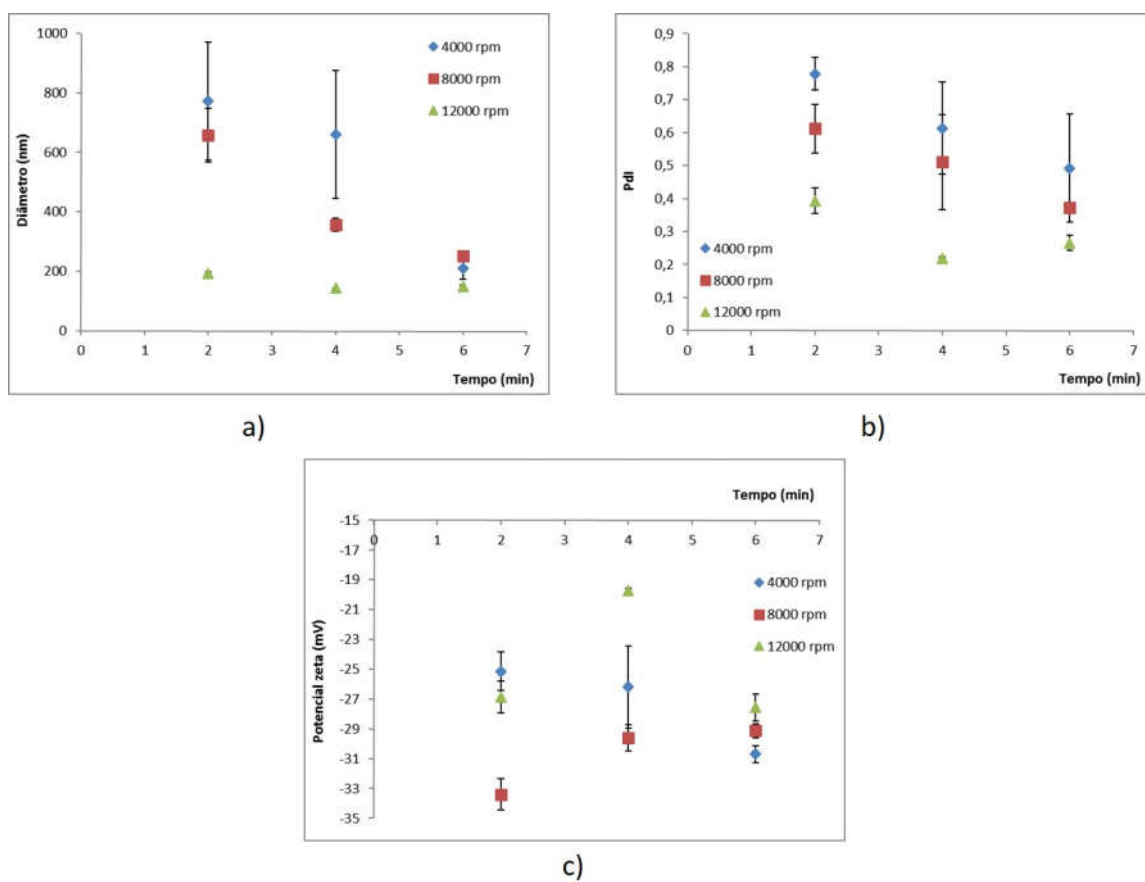


FIGURA 2. VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (A), ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (B) E POTENCIAL ZETA (C) EM RELAÇÃO A VELOCIDADE DE HOMOGENEIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis*.

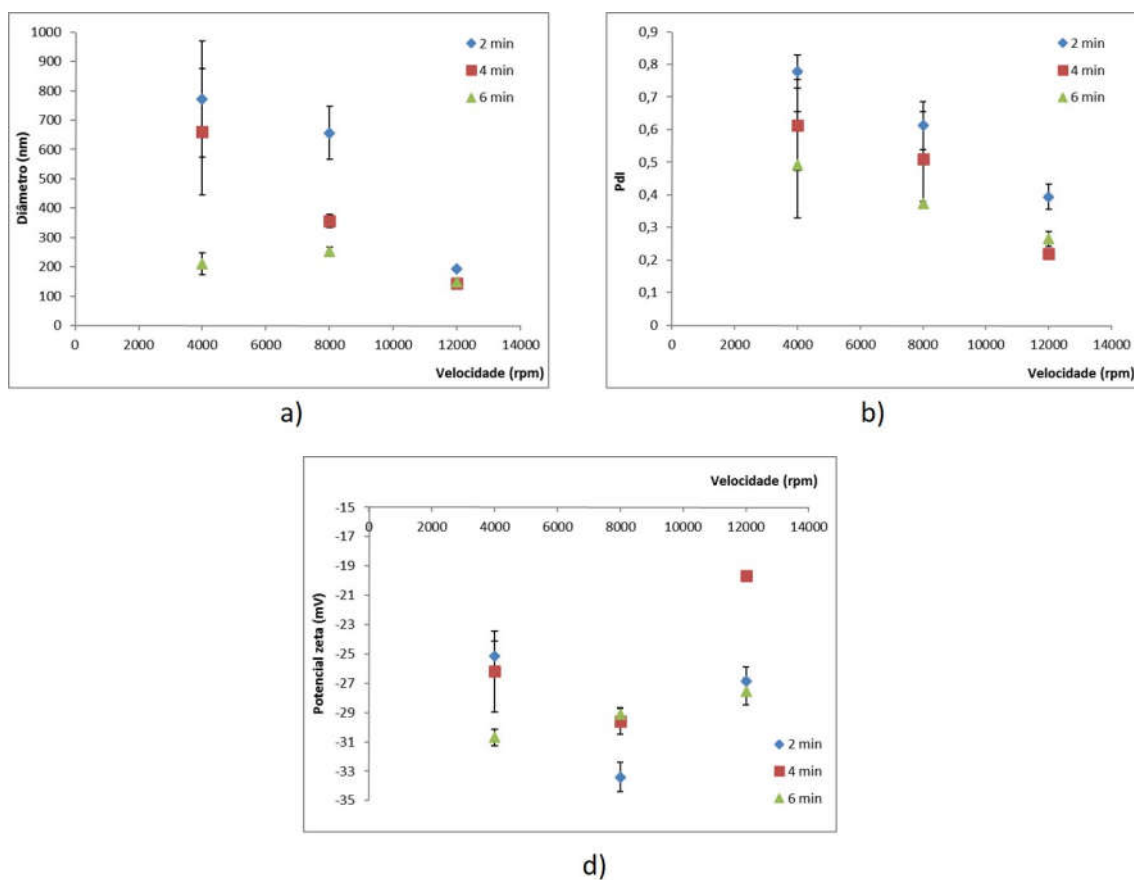


TABELA 1. POTENCIAL ZETA, DIÂMETRO DE GOTA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (Pdl) DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. brejoensis* OBTIDAS POR HOMOGENEIZAÇÃO A 12000 rpm DURANTE 4 MINUTOS.

Velocidade de rotação	Tempo	Potencial Zeta	Diâmetro	Pdl ^a	População
(rpm)	(min)	(mV)	(nm)		
12000	4	-19,8	141,9	0,215	Monomodal
12000	4	-19,6	144,1	0,221	Monomodal
12000	4	-19,7	143,4	0,222	Monomodal
MÉDIA		-19,7	143,1	0,219	
DESVIO PADRÃO		0,1	1,1	0,004	

^a Pdl: índice de polidispersidade.

4. Conclusões

O desenvolvimento de nanoemulsões de OEB utilizando o método de homogeneização é possível e pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos da degradação do óleo essencial quando expostos a condições ambientais e também aumentar a solubilidade do mesmo. Durante a emulsificação, o diâmetro das gotas pode ser controlado quando submetidos a diferentes velocidades e tempos de rotação. As nanoemulsões de OEB mais estáveis foram obtidas a 12000 rpm e 4 minutos de rotação. Entretanto, estudos futuros são necessários a fim de verificar a bioatividade destas formulações.

5. Referências

BHARGAVA, K. et al. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69–73, 2015.

BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2014, p. 651593, 29 maio 2014.

- CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chem**, v. 172, p. 298–304, 2015.
- DA SILVA, A. G. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1441–1447, 2 nov. 2015.
- FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1-3, p. 53–58, dez. 2004.
- GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. New records of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae) and complementary description. **Check List**, v. 10, n. 5, p. 1176–1178, 2014.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, ago. 2008.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89–121, 6 dez. 2000.
- M.R.MANGALE et al. Nanoemulsion: As Pharmaceutical Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 46, p. 244–252, 2015.
- MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 4, p. 775–777, 2008.
- MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 182–9, 17 abr. 2009.
- MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chem**, v. 194, p. 410–415, 1 mar. 2016.
- OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188–194, 2014.
- RAJALAKSHMI, R.; MAHESH, K.; KUMAR, C. K. A. A CRITICAL REVIEW ON NANO EMULSIONS. **International Journal of Inovative Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2011.

- SAJJADI, S.; ZERFA, M.; W. BROOKS, B. Dynamic behaviour of drops in oil/water/oil dispersions. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 4, p. 663–675, fev. 2002.
- V, D.; RAVICHANDRAN V. Nanoemulsion as modified drug delivery tool. **INTERNATIONAL JOURNAL OF COMPREHENSIVE PHARMACY**, v. 2, n. 1-6, 2011.
- WINSOR, P. A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, n. 0, p. 376–398, 1948.
- YANG, H. J.; CHO, W. G.; PARK., S. A. Stability of oil-in-water nanoemulsion prepared using the phase inversion composition method. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 15, p. 331–335, 2009.

5 CONCLUSÕES

- A partir das análises de GC-MS e GC-FID foi possível determinar a composição química do óleo essencial de folhas de *E. brejoensis*;
- O óleo essencial de *E. brejoensis* apresentou uma atividade antifúngica *in vitro* contra leveduras e dermatófitos causadores de importantes infecções fúngicas em humanos;
- Dois sistemas de veiculação do óleo essencial de *E. brejoensis* foram desenvolvidos: um baseado em inclusão molecular com β -ciclodextrina e outro em nanoemulsões;
- A inclusão molecular com β -ciclodextrina promoveu a retenção dos componentes voláteis do óleo essencial de *E. brejoensis* e isto possibilitou a liberação gradual dos seus componentes e a proteção do óleo contra os efeitos da temperatura;
- Por meio do método de homogeneização foi possível produzir nanoemulsões do óleo essencial de *E. brejoensis* com diâmetro médio de gota de aproximadamente 143 nm;
- Um modelo experimental *in vivo* será desenvolvido a fim de comprovar a ação antifúngica do complexo molecular do óleo essencial de *E. brejoensis* e β -ciclodextrina;
- Estudos adicionais utilizando *docking* molecular serão realizados a fim de estudar a interação dos componentes biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e espatulenol na β -ciclodextrina. Este estudo determinará os tipos de interações químicas presentes entre a ligação da β -ciclodextrina com cada composto, a influência do ponto de ebulição na volatilidade, bem como o cálculo de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade e assim, justificará a diferença de comportamento de liberação entre os componentes;
- Testes de bioatividade serão realizados nas nanoemulsões.