

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Luís Fernando Nunes Alves Paim

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS COMPOSTOS  
MAJORITÁRIOS CARVONA E LIMONENO DE *POIRETIA LATIFOLIA* VOGEL  
ISOLADOS E ASSOCIADOS A UMA NANOEMULSÃO**

Porto Alegre

2017

Luís Fernando Nunes Alves Paim

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS COMPOSTOS  
MAJORITÁRIOS CARVONA E LIMONENO DE *POIRETIA LATIFOLIA* VOGEL  
ISOLADOS E ASSOCIADOS A UMA NANOEMULSÃO**

Trabalho de conclusão de curso de pós graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Irene C. K. Guerreiro

Co-Orientadora: Prof. Dra. Miriam Anders Apel

Porto Alegre

2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Paim, Luís Fernando Nunes Alves

Atividades biológicas do óleo essencial e dos compostos majoritários carvona e limoneno de *Poiretia latifolia* Vogel isolados e associados a uma nanoemulsão / Luís Fernando Nunes Alves Paim. -- 2017. 109 f.

Orientador: Irene Clemes Kulkamp Guerreiro.  
Coorientador: Miriam Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Poiretia latifolia*. 2. Óleos essenciais. 3. Carvona. 4. Limoneno. 5. Nanoemulsão. I. Guerreiro, Irene Clemes Kulkamp, orient. II. Apel, Miriam Anders, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

“A semente que a mim confiaste vingou. Irrigada pela luta diária e protegida em meu espírito de luta cresceu, floriu e frutificou. Ao mundo, como forma de gratidão, devolvo este pequeno trabalho para que o Senhor possa confiar às gerações futuras. Obrigado a você Deus Criador pelo dom da confiança. Espero jamais prover-te decepção. Confesso que muitas vezes senti-me abatido, cansado e quase totalmente contaminado pela vontade de desistir, embora, em de tua calma furti a minha inspiração. Obrigado por não ter desistido de emprestar-me a tua luz. Eu o seguirei, porque a luz que emite é fonte de sabedoria, é o instrumento para iluminar a mim e aos meus.”

Certamente, vocês, Pai Miguel e Mãe Valni, estão orgulhosos. Foi durante essa caminhada de quase dois anos que a vida me furtou suas existências. O campo de luz é o lugar onde hoje habitam. Deus os conduziu a um novo mundo, embora, eternamente, vivem e permanecem em nossos corações. A morte não é nem de perto o fim da existência. A morte é apenas uma passagem. Não morre quem é lembrado. Aquele que enfeitou este mundo enquanto aqui existiu. Sigo seus passos, pelos caminhos da sabedoria, espero superar vocês como prova que todos evoluímos e que seus ensinamentos surtiram efeito sobre mim. Digo a você meu pai que seguirei teus passos na docência de ensinamentos que os livros são incapazes de reproduzir. Digo a você minha mãe, que como você, nunca desistirei de nada, que serei forte e trabalhador. Obrigado por tudo, mas acima de tudo pela calma herdada e decência para com a vida e para com os outros, eis de vocês a maior herança.

Confesso aqui o meu egoísmo a você meu irmão Miguel, eu queria tanto ter você aqui, sempre fui dependente de tua presença em minha vida, embora precocemente partiu. Levaste contigo boa parte de mim. A vida desde então perdeu boa parte do sentido. Hoje ao lado do nosso Pai e nossa Mãe certamente está igualmente orgulhoso por essa conquista. Sinto imensa saudade. Todos os dias agradeço pelos momentos que compartilhamos e até hoje me inspiram a ser alguém melhor. Um dia estaremos novamente juntos e aí então será para sempre, meu eterno irmão nesta vida e em outras mil.

Aos meus irmãos Júlio e Paulo companheiros indissociáveis dessa vida dos quais furto a força para a existência sou eternamente grato. Em vocês encontro o sentido para cada um dos meus passos, obrigado por existirem, obrigado pela cumplicidade, pelo entendimento, pela partilha dos momentos e por terem nascido como meus irmãos.

A você professora Irene, fonte inesgotável de luz, que a mim concedeu a confiança, quero poder lembrar-te que teu trabalho e exemplo de vida é um mapa perfeito para quem deseja vencer na vida. Obrigado pela generosidade de compartilhar tudo o que possui. A vida a ti será regada de boas recompensas. Talvez não encontre entre os humanos toda a gratidão que merece, embora, perante a Deus colherá tudo o que sempre semeou entre nós. Obrigado.

A você professora Miriam, sempre presente e disposta a ajudar reservo um lugar especial em minhas lembranças, estará guardada entre as mais confiáveis e prestativas de todas que até então conheci. Por tudo, muito obrigado.

Ao estimável professor Alexandre Fuentesfria, dedico essas linhas. Há algum tempo foi meu professor de graduação, hoje o destino o repôs na minha história, em todos os

momentos senti-me inspirado pela tua forma de ensinar, pelo jeito inovador, pela acessibilidade e pela amizade a qual não oxida com o tempo. Um abraço.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Mariana, Mosiele, Simone e Samuel com os quais compartilhamos as angústias e dividimos bons momentos desejo uma amizade duradoura pelo tempo de nossas existências. Hoje somos, todos, caminhada e, logo ali, merecedores dos frutos das sementes que lançamos.

O maior tesouro conquistado nessa caminhada foi o garimpar de pessoas boas: Letícia, Carol, Laisa, Krissie, Daiane. A cidade grande não corrompeu os princípios humanos de vocês, isto prova que vocês são preciosidades, pessoas que o mundo precisa que somam e que importam. A cada uma pelo tempo a mim dedicado, pela parceria na pesquisa agradeço imensamente.

Qualquer descoberta científica é ponto de partida, não de chegada. Isto porque a ciência é caminho infinito, sem dono, abstrato, embora de enorme sentido. Nada na ciência é eterno, absoluto ou verdade irrefutável. O que existe na ciência é possibilidade: possibilidade de fazer diferente, de inovar, de melhorar e complementar o que já existe. A ciência é uma criação divina para desafiar os homens que pensam daqueles que apenas existem e para separar os de vontade fraca com os de força inabalável. A ciência é o instrumento de Deus para nos desafiar a entender qual é o nosso lugar no mundo, para termos em mente que somos parte do universo e não o centro de todas as coisas. É a ciência que torna o animal *Homo sapiens* um ser verdadeiramente humano... Deus em sua ciência da criação foi o maior cientista de todos. Obrigado senhor por nos emprestar temporariamente o dom de fazer ciência. (Luís Fernando N. A. Paim)

## RESUMO

A espécie *Poiretia latifolia* Vogel pertence à família *Leguminosae*, nativa da região sul do Brasil, pouquíssimo estudada pela comunidade científica tanto do ponto de vista químico quanto do farmacológico. Entretanto, relata-se que contém entre seus compostos secundários cerca de 0,4% de óleos essenciais. Este trabalho visou desenvolver nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Poiretia latifolia* e seus constituintes majoritários carvona e/ou limoneno e avaliar as atividades antioxidantes, antibacteriana e antifúngica do óleo e das formulações obtidas. Assim, obteve-se, pelo método de hidrodestilação, o óleo volátil de folhas frescas desta espécie em diferentes estádios de desenvolvimento (brotamento, frutificação e floração). Na análise da composição química do óleo obtido foi possível identificar 21 compostos com predominância dos monoterpenos carvona (27,69%), *trans*-dihidrocarvona (37,08%) e limoneno (23,23%), seguindo-se dos compostos  $\beta$ -pineno (3,31%), e *cis*-pinocanfona sendo essa última detectável apenas nos estádios de brotamento e floração (6,08%). A determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) para os compostos carvona e limoneno revelou os valores de 9 e 11, respectivamente. A partir do óleo essencial e seus compostos majoritários, limoneno e carvona, foi possível a obtenção de nanoemulsões utilizando-se o método de inversão de fases a temperatura ambiente de 25 °C, contendo 5% de princípio ativo e 5% de tensoativos, com tamanho médio de partícula inferior a 400 nm. A atividade antioxidante foi realizada pela metodologia do sequestro do radical DPPH, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Os resultados demonstram que o óleo de *P. latifolia* puro mostrou-se eficiente no ensaio de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico com valor de IC50% de 508,20  $\mu\text{g/mL}$ . Com relação à atividade antifúngica, a atividade da associação carvona + limoneno demonstrou importante atividade frente ao fungo *Trichophyton rubrum*, apresentando um valor de CIM de 4  $\mu\text{g/mL}$  para o sistema isolado e de 64  $\mu\text{g/mL}$  para o sistema nanoemulsionado, contendo 5% dos compostos associados na proporção de 1/1 (p/p). Frente a estes resultados, conclui-se que o óleo essencial de *Poiretia latifolia* tem potencial para ser usado como conservante de sistemas hidrofóbicos e a associação dos compostos majoritários carvona e limoneno mostra efeito sinérgico como agente antifúngico para o controle do agente dermatofítico *Trichophyton rubrum*.



## ABSTRACT

*Poiretia latifolia* is a species belonging to the family *leguminosae*, native to the southern region of Brazil, very little studied by the scientific community. It contains, among its secondary compounds, about 0.4% of essential oils. This work aimed to develop nanoemulsions containing the essential oil of *Poiretia latifolia* and its major compounds carvone and / or limonene; and to evaluate the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the oil, major compounds and the formulations obtained. Thus, the volatile oil of fresh leaves of this species at different stages of development (budding, fruiting and flowering) was obtained by the hydrodistillation method. In the analysis of the chemical composition of the oil obtained, it was possible to identify 21 compounds with predominance of the monoterpenes carvone (27.69%), *trans*-dihydrocarvone (37.08%) and limonene (23.23%), followed by  $\beta$ -pinene (3.31%), and *cis*-pinocanfone detectable only at the budding and flowering stages (6.08%). The determination of EHL for the carvone and limonene compounds showed values of 9 and 11, respectively. From the essential oil and its major compounds, limonene and carvone, it was possible to obtain nanoemulsions using the inversion phase method at room temperature. The formulations contained 5% of active principle and 5% of surfactants, with size mean of less than 400 nm. The antioxidant activity was performed by the sequestration method of the DPPH radical, thiobarbituric acid reactive species (TBARs) and  $\beta$ -carotene / linoleic acid. The results showed that pure *P. latifolia* oil was efficient in the assay of  $\beta$ -carotene/linoleic acid with IC 50% of 508.20  $\mu\text{g/mL}$ . In relation to the antifungal activity, the activity of the carvone and limonene association showed an important activity against the *Trichophyton rubrum* fungus. The MICs values were 4  $\mu\text{g/mL}$  and 64  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, for isolated compounds and the nanoemulsified system containing 5% of limonene and carvone in the ratio of 1/1 (w / w). As conclusion, the essential oil of *Poiretia latifolia* has potential to be used as a preservative of hydrophobic systems. The major compounds carvone and limonene combination shows a synergistic antifungal effect for the control of the dermatophytic agent *Trichophyton rubrum*.

## LISTA DE ABREVIações

ATCC – *American type Culture Collection*

BHA - butilato de hidroxinisol

BHT - butilato de hidroxitolueno

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EHL – Equilíbrio hidrófilo – lipófilo

GABA – ácido gama aminobutírico

IC50 – Concentração inibitória 50%

ICN – Instituto de Ciências Naturais

MOPS - ácido morfolinopropanosulfônico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RPM – Rotações por minuto

SUS – Sistema Único de Saúde

TBARs – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

UFC – Unidades formadoras de colônia

WHO- *World Health Organization*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O carbono nos metabolismos primário e secundário.....	25
Figura 2: <i>Poiretia tetraphylla</i> em estágio de brotamento.....	29
Figura 3: <i>Poiretia latifolia</i> em estágio de brotamento.....	29
Figura 4: Espécie <i>Poiretia latifolia</i> registrada em Muitos Capões – .....(RS).	31
Figura 5: Representação das estruturas químicas dos isômeros do composto limoneno.....	33
Figura 6: Representação das estruturas químicas dos isômeros do composto carvona.....	34
Figura 7: Desenho experimental da pesquisa.....	45
Figura 8: Ponto de coleta da espécie <i>Poiretia latifolia</i> em Ipê – (RS).....	46
Figura 9: Modelo esquemático do método de produção de nanoemulsão por inversão de fases.....	52
Figura 10: Refratômetro analógico para determinação do índice de refração da amostra.....	53
Figura 11: Exsicata de <i>Poiretia latifolia</i> .....	64
Figura 12: Estruturas anatômicas características da espécie <i>Poiretia latifolia</i> .....	65
Figura 13: <i>Poiretia latifolia</i> em estágio de brotamento.....	66
Figura 14: <i>Poiretia latifolia</i> em estágio de floração.....	66
Figura 15: <i>Poiretia latifolia</i> em estágio de frutificação.....	66
Figura 16: Variação dos compostos beta-pineno, limoneno, <i>cis</i> -pinocanfona, <i>trans</i> -dihidrocarvona, e carvona em razão dos estádios de desenvolvimento da <i>Poiretia latifolia</i> .....	70
Figura 17: Rota bioquímica de formação do composto carvona.....	70

Figura 18: Emulsões produzidas para estudo de EHL.....	75
Figura 19: Índice de refração da amostra para a nanoemulsão.....	79
Figura 20: Volume médio em nanômetros das gotículas que formam as nanoemulsões produzidas a partir do óleo essencial de <i>Poirertia latifolia</i> e seus compostos majoritários.....	81

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenoides.....26

Quadro 2: Divisão das espécies vegetais do gênero *Poiretia* segundo as seções....28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual dos agentes tensoativos nas formulações testadas.....	49
Tabela 2: Composição em gramas das formulações para estudo do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerido pelos compostos limoneno o/ou carvona.....	50
Tabela 3: Análise bianual da variação qualitativa e quantitativa da composição dos óleos essenciais da espécie <i>Poiretia latifolia</i> em razão dos diferentes estádios de desenvolvimento.....	67
Tabela 4: Compostos mais prevalentes no óleo essencial da espécie <i>Poiretia latifolia</i> em razão dos diferentes estádios de desenvolvimento.....	69
Tabela 5: Avaliação macroscópica das formulações para determinação do EHL requerido para o composto isolado limoneno após 24 horas.....	74
Tabela 6: Formulações para estudo de EHL contendo limoneno onde não houve coalescência.....	75
Tabela 7: Avaliação macroscópica das formulações para determinação do EHL requerido para o composto isolado carvona após 24 horas.....	76
Tabela 8: Formulações para estudo de EHL contendo carvona onde não houve separação das fases.....	77
Tabela 9: Atividade antioxidante do padrão ácido ascórbico, do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado frente ao ensaio de DPPH.....	82
Tabela 10: Atividade antioxidante do padrão BHT, do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado frente ao ensaio de TBARS.....	86

Tabela 11: Atividade antioxidante do padrão BHT, do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado frente ao ensaio de $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	88
Tabela 12: Screening frente aos fungos leveduriformes do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e nanoemulsionados.....	90
Tabela 13: Screening frente aos fungos dermatófitos do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado.....	92
Tabela 14: Ensaio <i>in vitro</i> frente aos fungos dermatófitos ( <i>Trichophyton rubrum</i> 43 e 51) sensíveis no teste de Screening para o sistema combinado Carvona + Limoneno 1/1 (p/p) isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado.....	95
Tabela 15: Screening de atividade antibacteriana do óleo essencial e dos compostos majoritários de <i>Poiretia latifolia</i> isolados e incorporados ao sistema nanoemulsionado.....	96

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 AS PLANTAS MEDICINAIS E A FARMACOLOGIA.....	19
2.2 AS PLANTAS E O MERCADO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	21
2.2 O METABOLISMO DOS VEGETAIS.....	24
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
2.4 GÊNERO <i>POIRETIA</i> .....	28
2.5 ESPÉCIE <i>POIRETIA LATIFOLIA</i> .....	31
2.6 LIMONENO .....	32
2.7 CARVONA.....	34
2.8 ANTIOXIDANTES E AS ESPÉCIES REATIVAS.....	36
2.9 ÓLEOS ESSENCIAIS E A PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS .....	38
2.10 SISTEMAS COLOIDAIIS E NANOEMULSÕES .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
OBJETIVO GERAL .....	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	46
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	47
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS .....	47
4.5 AQUISIÇÃO DOS PADRÕES TERPÊNICOS CARVONA E LIMONENO .....	48
4.6 ESTUDO DE EQUÍLIBRIO HIDRÓFILO / LIPÓFILO (EHL).....	48
4.7 PREPARO DE NANOEMULSÕES PELO MÉTODO DE INVERSÃO DE FASES E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	51
4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES .....	53
4.9 ENSAIO DE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA (DPPH) .....	54
4.10 ENSAIO DO B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO .....	55
4.11 ENSAIO DO TBARS.....	56
4.11.1 Preparo dos lipossomas e ensaio de TBARS.....	56
4.12 MICRORGANISMOS, INÓCULO E SREENING ANTIFÚNGICO.....	57
4.12.1 Microrganismos .....	57
4.12.2 Obtenção do inóculo.....	58
4.12.3 Screening antifúngico .....	58
4.12.4 Determinação da concentração inibitória mínima.....	59
4.13 SCREENING ANTIBACTERIANO.....	61



4.13.1 Microorganismos .....	61
4.13.2 Obtenção do inóculo.....	61
4.13.3 Screening .....	61
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS .....	63
5.2 ÓLEO ESSENCIAL RENDIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES .....	65
5.3 ESTUDO DO EQUILÍBRIO HIDRÓFILO-LIPÓFILO (EHL) COMPOSTOS MAJORITÁRIOS .....	73
5.3.1 EHL Limoneno.....	73
5.3.2 EHL carvona.....	76
5.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES..	77
5.5 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES PELO MÉTODO DE INVERSÃO DE FASES.....	79
5.6 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE FRENTE AO RADICAL DPPH .....	81
5.7 ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBARS) .....	85
5.8 ENSAIO B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO .....	87
5.9 SCREENING DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	89
5.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	94
5.11 SCREENING DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	96
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são fontes inesgotáveis de compostos ativos. Desde os tempos mais remotos o homem vem se beneficiando dessa fonte de recursos. A utilização das plantas como alimento ou como fonte de alívio aos problemas de saúde se confunde com a história e com desenvolvimento das civilizações.

Nosso país detém a maior biodiversidade do planeta e contrapondo-se a isto, se relata que somos quase que inteiramente dependentes das matérias primas vegetais importadas. A maior parte dos produtos de origem vegetal comercializados em nosso território advém de espécies vegetais não relacionadas com a nossa flora (BRASIL, 2016a).

Atualmente, boa parte da população volta seu interesse pela busca por uma vida mais saudável e sustentável e os produtos obtidos de fontes naturais vão ao encontro dessa eminente demanda. A resistência dos patógenos frente ao arsenal terapêutico usado na clínica médica também tem sido constantemente relatada (MÉNDEZ-TOVAR et al., 2007; MICELI; LEE, 2011; PEREA; PATTERSON, 2002; VELÁZQUEZ-ACOSTA et al., 2016). Muitos destes agentes são ainda responsáveis por importantes perdas com a deterioração de alimentos e outros produtos provocando sérios danos à saúde humana e animal. Além disso, a contaminação dos produtos por fungos e bactérias e as reações de oxidação relacionadas, são responsáveis pela inutilização de muitos dos produtos destinados ao consumo humano e animal. Aliando-se a isto, tem-se que os conservantes químicos usados pela indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica são altamente tóxicos e estão diretamente relacionados a uma maior prevalência de doenças, inclusive o câncer (ANDRADE et al., 2012; CANSIAN et al., 2010).

Desta forma, a busca por alternativas eficazes frente a estas demandas torna-se de grande relevância. Primeiramente, porque o estudo do potencial farmacológico de espécies nativas pode trazer inúmeros benefícios à população, os quais incluem aspectos que vão desde o aproveitamento dos recursos vegetais presentes no meio, incluindo um aumento da consciência preservacionista da nossa biodiversidade e finalmente obtendo uma independência frente a necessidade de importação de matérias primas vegetais de outros países.

Com isto se gera renda, conhecimento e autonomia para a nossa população. Como uma das alternativas para a otimização e melhoria da eficiência dos produtos a tecnologia farmacêutica e nanotecnologia podem desempenhar um papel estruturador deste novo paradigma, o qual pode ter uma faceta voltada para o aproveitamento dos recursos naturais de nossa flora. Sabe-se que a diversidade natural e a transformação em conhecimento das potencialidades relacionadas a flora brasileira estão longe de serem esgotadas (SIMÕES et al., 2016).

A espécie *Poiretia latifolia* é nativa usada na medicina tradicional nos três estados do sul, com distribuição endêmica, a qual vem sendo usada popularmente para problemas estomacais, impotência e como aromatizante do chimarrão (DONAZZOLO et al., 2013; JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). Há relatos que essa espécie tem em sua composição química importante concentração de óleos essenciais e muitos dos usos tradicionais não foram ainda comprovados cientificamente (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988).

Portanto, objetiva-se neste trabalho resgatar uma espécie vegetal nativa, muito pouco estudada, *P. latifolia*, com o intuito de se proceder uma avaliação das atividades antioxidantes e antimicrobianas do óleo essencial e seus compostos majoritários livres e associados a um sistema nanoemulsionado.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AS PLANTAS MEDICINAIS E A FARMACOLOGIA

Nos últimos séculos com o advento da indústria e o desenvolvimento da química orgânica foi observado uma preferência pelos produtos sintéticos, com isto, os compostos químicos passaram a ser facilmente obtidos. Modificações estruturais foram produzidas nos fármacos, aumentando o poder econômico das empresas farmacêuticas (RATES, 2001). A nova abordagem farmacológica das sociedades ocidentais altamente industrializadas marginalizou a cultura dos produtos naturais e esses recursos foram durante muito tempo considerados uma opção terapêutica para pessoas de baixa renda, baixa escolaridade ou simplesmente atreladas à superstição religiosa com pouco ou mesmo nenhum valor terapêutico (RATES, 2001). Trabalhos recentes afirmam que nos países em desenvolvimento, devido às limitações financeiras dos seus habitantes, aproximadamente 80% da população ainda depende de extratos vegetais como tratamento (SHARIFI-RAD et al., 2015).

Contraopondo-se aos pontos que marginalizam a importância dos produtos naturais para a prática da medicina moderna, alguns autores afirmam que 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo advêm de plantas e 11% dos medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são exclusivamente de origem vegetal (RATES, 2001). Os exemplos de medicamentos advindos direta ou indiretamente de fontes naturais passam muitas vezes despercebidos entre as páginas dos livros de farmacologia contemporâneos. Para elencar alguns, basta citar os exemplos da digoxina obtida da espécie *Digitalis lanata* Ehrh, a morfina oriunda da *Papaver somniferum* L, a atropina da *Atropa belladonna* L., a vincristina e a vimblastina da *Catharanthus roseus*(L.) G. Don. Os

exemplos apresentados confirmam a constatação que as fontes naturais são reconhecidamente importantes para a descoberta de novas moléculas contribuindo para pesquisas farmacológicas e conseqüentemente para o desenvolvimento de novos fármacos. Essas constatações não se limitam somente quando os constituintes naturais são usados de forma direta, mas também quando servem de molde para a síntese de novos compostos bioativos (BRASIL, 2016a).

O reconhecimento da importância dos compostos naturais por algumas entidades ligadas ao setor da saúde está atualmente voltando ao centro das discussões científicas (BRASIL, 2016a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Estes últimos quarenta anos foram marcados pela retomada aos medicamentos naturais. O marco deste retorno pode ser relacionado com a Declaração de Alma Ata, publicada pela Organização Mundial de Saúde, no ano de 1978. Este documento enfatiza que os governos devem zelar pelos cuidados primários à saúde, os quais devem estar baseados em métodos e tecnologias de ordem prática, socialmente aceitas, com características universais e colocadas ao alcance dos indivíduos, das famílias e das comunidades (WHO, 1978). A fitoterapia tem muita relação com estes conceitos, visto que é uma prática que acompanha o homem desde tempos primordiais. Com isso, a utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos voltou a ganhar lugar de destaque nas políticas da saúde em muitos países. No Brasil isto não foi diferente, no ano de 2016 houve a publicação de uma importante obra sobre em comemoração aos dez anos da aprovação da Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos(PNPMF) (BRASIL, 2016a). Entre as diretrizes desse programa os termos manejo sustentável, reconhecimento de práticas populares, incentivo a novas tecnologias e fomento à pesquisa com plantas medicinais

foram contemplados demonstrando um interesse governamental frente a esse setor (BRASIL, 2016a).

A pesquisa com plantas medicinais permite através da incorporação de tecnologias a garantia, a promoção da segurança, da eficácia e da qualidade no acesso aos produtos advindos de fontes vegetais (BRASIL, 2016a). O uso sustentável da biodiversidade aliado ao aprimoramento do conhecimento pode ser uma fonte de renda e autonomia para a nossa sociedade. Fomentar as pesquisas com espécies nativas e promover o desenvolvimento tecnológico é uma das metas estabelecidas pela PNPMF pensada para a nossa realidade (BRASIL, 2016a).

Neste trabalho, o objeto de estudo é uma planta nativa usada popularmente pela população do sul do Brasil (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988; MULLER, 1984), comumente chamada de erva-de-touro, e cientificamente denominada de *Poiretia latifolia* Vogel. Cabe destacar que os estudos das atividades biológicas dos compostos do metabolismo secundário das espécies do gênero *Poiretia*, bem como, para a espécie *P. latifolia* ainda são escassos no meio científico. Este pequeno número de estudos científicos com os compostos derivados do metabolismo secundário desta espécie vegetal corrobora a constatação que os estudos com plantas nativas do Brasil ainda são escassos e as potencialidades do uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas (BRASIL, 2016a).

## 2.2 AS PLANTAS E O MERCADO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

As plantas medicinais fazem parte da vida do homem desde os primórdios da civilização, sendo que até o século XIX os recursos terapêuticos predominantes na prática médica advinham de fontes vegetais (SIMÕES et al., 2000). Os anos

posteriores ao século XIX foram marcados pelo advento da indústria farmacêutica com bases na indústria química, os quais foram fortemente ligados à busca de substâncias ativas em laboratórios de síntese orgânica. Entretanto, este cenário quase totalmente voltado ao setor químico começou a mudar após o ano 2000. Os governos e os órgãos regulatórios da saúde, tanto no Brasil quanto em nível mundial, passaram a estimular o retorno para a fitoterapia sendo essa ciência elevada ao posto de prática médica integrativa e complementar de grande reconhecimento pela comunidade científica. Este novo cenário é corroborado pelas constantes publicações sobre o assunto publicadas pelos órgãos regulatórios da saúde. No ano de 1999, a OMS publicou o primeiro volume das Monografias das Plantas Medicinais Seleccionadas a qual continha 28 espécies vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Nos anos posteriores houve a publicação de outros três volumes os quais compreendem cerca de 120 monografias de plantas medicinais as quais são ricamente estudadas quanto aos parâmetros de eficácia, de segurança e de controle de qualidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004, 2007, 2009). No cenário brasileiro, este marco de retorno a fitoterapia ganhou destaque no ano de 2006, quando da publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006) a qual incorpora a prática ao sistema público de saúde. Mais recentemente, já no ano de 2016 o Governo Brasileiro publicou o primeiro Memento Fitoterápico Nacional da Farmacopeia Brasileira o qual apresenta diversas monografias de plantas aos profissionais da saúde (BRASIL, 2016b).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, compreendendo cerca de 20% das espécies vegetais e animais catalogadas (RODRIGUES, 2016). Estima-se que existem neste planeta mais de 25.000 espécies vegetais com potencial para a aplicação em medicamentos fitoterápicos ou outros produtos com aplicação a

saúde (RODRIGUES, 2016). Dessa forma, é possível inferir que há no território brasileiro mais de 5.000 espécies com potencial para se transformarem em medicamentos ou em outros produtos de origem natural.

Quanto ao cenário nacional de medicamentos fitoterápicos, no ano de 2009 havia cerca de 600 especialidades farmacêuticas as quais advinham de cerca de 150 espécies medicinais sendo que somente 24 dessas têm origem no continente americano (BRASIL, 2016a). Esse número extremamente pequeno de medicamentos advindos de fontes locais pode estar relacionado à falta de incentivo a pesquisa com plantas originárias dos nossos ecossistemas. Entretanto, segundo algumas pesquisas mais recentes, a ampla diversidade vegetal brasileira desponta como uma perspectiva para o potencial de exploração econômica destes recursos (RODRIGUES, 2016).

O potencial de utilização de espécies medicinais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) está referendado numa relação de plantas medicinais elaborada no ano de 2009. Neste documento, o governo apresenta uma lista de 71 espécies medicinais priorizando a inclusão de espécies nativas (BRASIL, 2009). Essa relação de plantas compreende o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos instituído no ano de 2008 pela Portaria nº 2.960 (BRASIL, 2008).

Entretanto, entre os desafios para a utilização de plantas medicinais como fontes de moléculas bioativas, está o isolamento dos princípios ativos das espécies que as contém e o desenvolvimento de pesquisas sobre essas atividades biológicas. A superação deste obstáculo pode fortalecer a indústria nacional de medicamentos fitoterápicos, bem como, de outros produtos naturais e finalmente fomentar a cadeia produtiva desses setores (RODRIGUES, 2016), gerando emprego, renda e melhorando a qualidade de vida da população.



## 2.2 O METABOLISMO DOS VEGETAIS

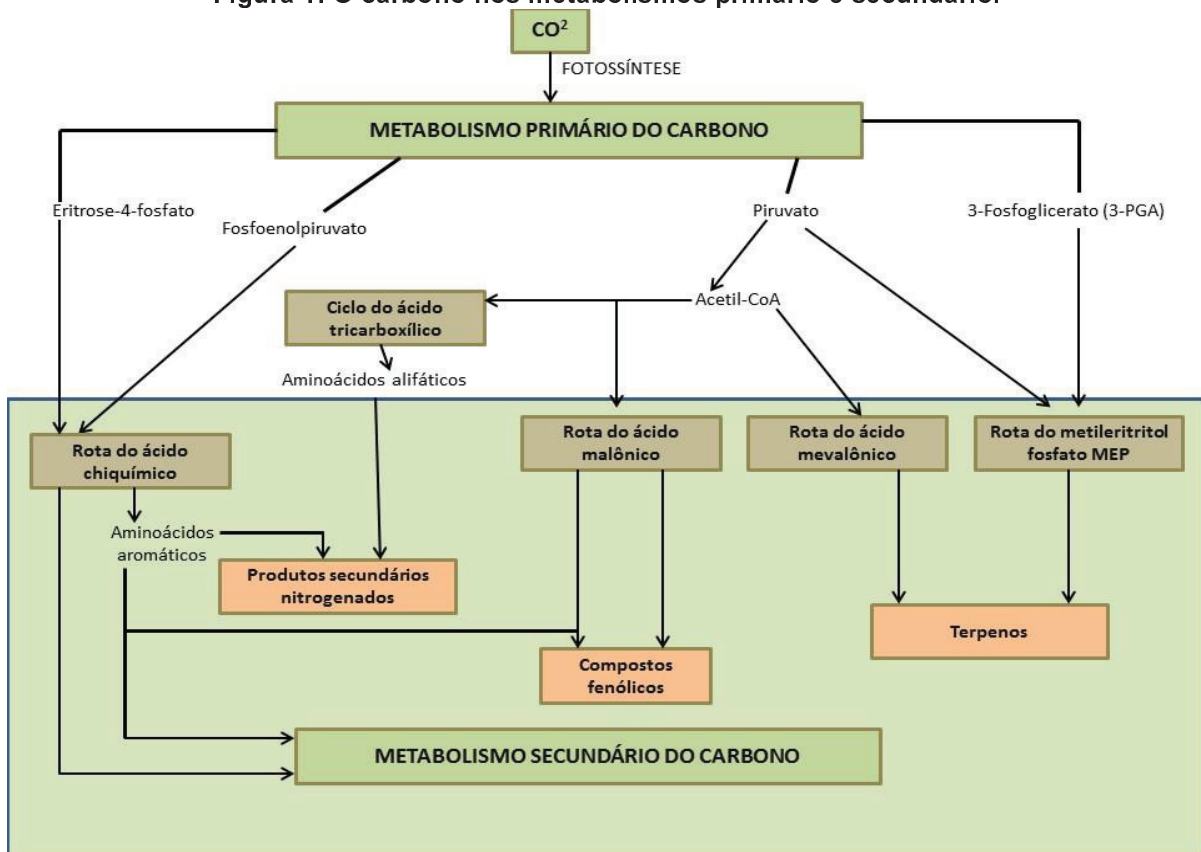
O metabolismo primário dos vegetais compreende um conjunto de reações químicas que dão origem a compostos que estão continuamente sendo produzidos em cada célula (SIMÕES et al., 2000). A presença de grupos enzimáticos específicos é responsável pelas rotas metabólicas envolvidas na formação destes compostos, os quais visam primariamente ao aproveitamento de nutrientes, à biossíntese de macromoléculas e ao aporte das exigências fundamentais da planta (SIMÕES et al., 2000). Deste modo, os compostos derivados do metabolismo primário apresentam alta similaridade entre os diferentes organismos, e fornecem suporte às teorias evolucionistas que pressupõe que estes seres derivam de um ancestral comum (SIMÕES et al., 2000).

Por outro lado, o metabolismo secundário é responsável por produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas diretamente com as funções primordiais da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estes compostos são um grupo heterogêneo de substâncias que aparentemente não tem função direta sobre as funções de crescimento e desenvolvimento da planta (SIMÕES et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013). Diferentemente dos compostos primários, os compostos secundários apresentam distribuição restrita nos vegetais, estando isolados a um grupo de espécies relacionadas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Durante muito tempo, os compostos do metabolismo secundários foram equivocadamente descritos como produtos de excreção (SIMÕES et al., 2000), e conseqüentemente, tinham sua função desconhecida (TAIZ; ZEIGER, 2013). Entretanto, nos dias atuais é sabido que essas substâncias têm funções fisiológicas importantes, sendo as principais descritas a seguir:

- Proteção das plantas contra animais herbívoros e contra a infecção por microrganismos patogênicos (TAIZ; ZEIGER, 2013);
- Atividade atrativa (odor, cor e sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2013);
- Atuação como agentes na competição planta-planta e na simbiose na relação planta *versus* microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2013);
- Defesa antioxidante frente ao dano causado pelos radicais livres (SIMÕES et al., 2016).

Didaticamente os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. A figura 1 apresenta as rotas simplificadas envolvidas na biossíntese destes compostos.

Figura 1: O carbono nos metabolismos primário e secundário.



### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Dentre os compostos oriundos do metabolismo secundário destacam-se os óleos essenciais, os quais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2000). Estes compostos são altamente voláteis (SIMÕES et al., 2016). Os componentes presentes em um óleo essencial diferem totalmente entre si em suas propriedades físicas e químicas quando comparados aos óleos fixos (WILLIAN C. E; EVANS DAPHNE, 2009). Entre as principais funções biológicas dos óleos essenciais para os vegetais, estão descritas funções fundamentais relacionadas com a defesa destes organismos frente ao ataque de predadores, como a proteção contra doenças causadas por microrganismos patogênicos, com a atração de insetos polinizadores (SIANI ANTONIO CARLOS et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013), ou ainda com a defesa antioxidante frente ao ataque de radicais livres (SIMÕES et al., 2016). Muitas espécies vegetais possuem misturas de monoterpenos e sesquiterpenos, os quais conferem aroma característico, sendo estes compostos frequentemente encontrados nos tricomas glandulares que se projetam da epiderme da folha e agem como advertência sobre uma possível toxicidade do vegetal produtor (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os terpenoides são classificados de acordo com o número de unidades de carbono que contém, conforme pode ser visualizado no quadro 1.

**Quadro 1: Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenoides.**

Número de unidades de isopreno	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	Isopreno
2	10	Monoterpenoides
3	15	Sesquiterpenoides
4	20	Diterpenoides
5	25	Sesterpenos
6	30	Triterpenoides
8	40	Tetraterpenoides
N	N	Polisoprenoides

Fonte: (SIMÕES et al., 2000) adaptado

Na mistura de substâncias que compõe o óleo essencial de uma planta, é comum que a ocorrência da concentração de uma substância específica predomine sobre as demais, sendo a substância mais abundante denominada de composto majoritário (SIMÕES et al., 2000). Algumas espécies medicinais e condimentares bastante difundidas no Brasil corroboram esta afirmação; na espécie (*Rosmarinus officinalis*) o principal constituinte químico do óleo essencial é o composto 1,8-cineol (57%) (RADAELLI et al., 2016), na (*Lippia sidoides* Cham) o composto majoritário é o timol (84%) (BRITO et al., 2015).

Os terpenos contidos nos óleos essenciais podem exibir uma ampla variedade de atividades biológicas. Essa diversidade de ações está descrita na literatura com aplicações e estudos como: antibacteriana (CANSIAN et al., 2010; EBRAHIMABADI et al., 2010; MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016; SHARIFI-RAD et al., 2015), antioxidante (EBRAHIMABADI et al., 2010), antifúngica (AGGARWAL et al., 2002; SHARIFI-RAD et al., 2015), incluindo outras inclusive de ação central, como ação analgésica, anticonvulsivante (GONÇALVES et al., 2010) e ansiolítica (BANSOD et al., 2012; ZHOU; YOSHIOKA; YOKOGOSHI, 2009).

Um crescente interesse dos consumidores por produtos funcionais obtidos a partir de fontes naturais vem ao encontro da aplicação dos óleos essenciais pela indústria alimentícia, de bebidas, de higiene e cosmética, visto que, estes produtos podem evitar a deterioração ocasionada por microrganismos e oxidação em compostos lipídicos (MIRANDA et al., 2016). Diferentes estudos tem sido conduzidos com o intuito de investigar as propriedades antioxidantes de óleos essenciais obtidos de diferentes vegetais (CANSIAN et al., 2010; EBRAHIMABADI et al., 2010; MIRANDA et al., 2016).

## 2.4 GÊNERO *POIRETIA*

O gênero *Poiretia* Vent. compreende 12 espécies vegetais divididas em duas seções: *Poiretia* Vent. e *Virgata* C. Muller (MULLER, 1984). A seção *Poiretia* conta com apenas uma espécie enquanto que a seção *Virgata* engloba 11 exemplares, conforme podem ser visualizadas no quadro 2.

**Quadro 2: Divisão das espécies vegetais do gênero *Poiretia* segundo as seções.**

Seção <i>Poiretia</i> Vent.	Seção <i>Virgata</i> C Müller	
<i>Poiretia punctata</i> (Willd.)	<i>Poiretia bahiana</i> C. Müller	<i>Poiretia elegans</i> C. Müller
	<i>Poiretia crenata</i> C. Müller	<i>Poiretia marginata</i> C. Müller
	<i>Poiretia mattogrossensis</i> C. Müller	<i>Poiretia carifolia</i> Vog.
	<i>Poiretia unifoliolata</i> Mello Barreto	<i>Poiretia longipes</i> Harms
	<i>Poiretia augustifolia</i> Vog.	<i>Poiretia tetraphylla</i> (Poir.) Burkart.
	<i>Poiretia latifolia</i> Vog.	

Fonte: Muller (1984) (MULLER, 1984).

No Rio Grande do Sul o gênero *Poiretia* está representado pelas espécies *Poiretia tetraphylla*, (figura 2), e *Poiretia latifolia*, (figura 3) (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). Essas plantas ocorrem em ambientes abertos, correspondendo a áreas de campo sempre distribuídas em manchas e utilizadas como medicinais pela população (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). Dentre os usos tradicionais da planta destaca-se a aplicação para problemas estomacais (FERNANDES, PATRÍCIA et al., 2011; JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988), propriedades inseticidas (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988), afrodisíacas (AMORIM, 2010; MULLER, 1984) e inibidoras do apetite (AMORIM, 2010).

**Figura 2: *Poiretia tetraphylla* em estágio de brotamento.**



Fonte: (SILVA, C. P, 2005).

**Figura 3: *Poiretia latifolia* em estágio de brotamento.**



Fonte: O autor.

Os estudos com as plantas do gênero *Poiretia* são ainda escassos na comunidade científica, incluindo:

- estudo taxonômico e aspectos farmacognósticos para o gênero *Poiretia* descritos por Janke e colaboradores (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988);
- testes das atividades biológicas preliminares para as espécies *Poiretia latifolia* e *Poiretia tetraphylla* realizados por Silva (SILVA, C. P, 2005);
- ensaio da atividade antimicrobiana dos compostos (*R*)-(-)-carvona, (1*R*, 4*R*)-*trans*-(+)-dihidrocarvona presentes no óleo essencial da espécie *Poiretia latifolia* realizados por Porto e colaboradores (PORTO et al., 2010);
- avaliação morfoanatômica e teste da atividade anti-inflamatória para a espécie *Poiretia tetraphylla* conduzido por Royer (ROYER, 2011);
- descrição da atividade tóxica para a espécie *Poiretia punctata* a animais de corte realizados por Nascimento e colaboradores (NASCIMENTO et al., 2014);
- relatos de atividade citotóxica *in vitro* para algumas linhagens celulares para extratos de *Poiretia bahiana* descritos por Pinho e colaboradores (PINHO et al., 2014);
- e estudo de atividade antimicrobiana para a *Poiretia bahiana* realizados por Fenandes e colaboradores (FERNANDES; SOUSA; DIAS, 2014).

Os breves relatos de estudos com a espécie *Poiretia punctata* em bovinos e ovinos demonstraram em nível experimental que a espécie é tóxica para estes animais ocasionando sinais clínicos como apatia e letargia que sugerem toxicidade ao sistema nervoso central (DE SOUSA BARROS et al., 2015) sem, no entanto, a elucidação dos mecanismos farmacológicos envolvidos. A atividade antimicrobiana frente a alguns fungos e bactérias foi demonstrada para a os óleos essenciais da espécie *Poiretia*

*bahiana* (ARAÚJO et al., 2009). Noutro estudo com *Poiretia latifolia* as atividades antimicrobianas e antioxidantes foram brevemente relatadas (PORTO et al., 2010).

## 2.5 ESPÉCIE *POIRETIA LATIFOLIA*

A *Poiretia latifolia* Vogel pertence à família *Fabaceae* e está presente em ecossistemas característicos de campos secos, pedregosos, gramíneos ou arbustivos tendo sua ocorrência registrada nos três estados do Sul do Brasil (DONAZZOLO et al., 2013). A espécie *Poiretia latifolia*, (figura 4), pode ser resumidamente descrita do ponto de vista botânico como um subarbusto a arbusto ereto que pode atingir até 1,1 metro de altura, sendo pouco ramificado na base, com folhas normalmente tri-folioladas no terço inferior e tetra-folioladas na terço superior (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988).

**Figura 4: Espécie *Poiretia latifolia* registrada em Município de Muitos Capões - RS.**



Fonte: O autor



A *Poiretia latifolia* possui flores com tamanho aproximado de 1 cm, amarelas, fruto na forma de lomento que varia entre 0,20 a 0,55 cm de comprimento o qual se divide em 4 a 8 artículos (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). A planta é conhecida pelos nomes populares de erva-de-touro-gráuda e/ou limãozinho-do-campo (nome popular usa-se hífem) (FERNANDES, PATRÍCIA et al., 2011; JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988).

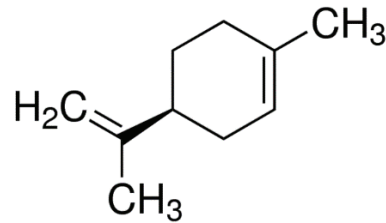
A espécie *Poiretia latifolia* vem sendo usada popularmente como planta medicinal contra afecções estomacais (FERNANDES, PATRÍCIA et al., 2011) e sua atividade inseticida também está relatada na literatura sem, no entanto, haver qualquer comprovação científica destes usos (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). Outros relatos apontam que essa planta apresenta potencial para uso cosmético, devido a presença de óleos voláteis aromáticos em sua composição foliar, fato que tem despertado o interesse na sua exploração comercial (FERNANDES, PATRÍCIA et al., 2011). Estudos farmacognósticos preliminares com esta espécie demonstraram que a mesma possui taninos, flavonoides, saponinas e óleos essenciais (JANKE; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 1988). Segundo a literatura entre os compostos químicos presentes no óleo essencial destacam-se altos percentuais dos compostos limoneno e carvona (PORTO et al., 2010)

## 2.6 LIMONENO

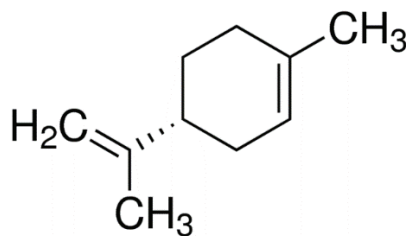
O limoneno é um monoterpeno hidrocarboneto presente no óleo essencial de muitas plantas que apresenta um centro quiral em sua molécula química e desta forma pode ser biossintetizado em duas formas enantioméricas, (figura 5), R – (-) – ou S –

(+) limoneno por muitas espécies vegetais (AGGARWAL et al., 2002; DE SOUSA BARROS et al., 2015; PEIXOTO et al., 2015).

**Figura 5: Representação das estruturas químicas dos isômeros do composto limoneno.**



S – (+) – Limoneno



R – (-) – Limoneno

O limoneno foi descrito como segundo principal constituinte químico da espécie vegetal *Mentha spicata* L. com percentual de 26% (KEDIA et al., 2014). Similarmente, apresenta concentração aproximada de 20% na espécie *Xanthium strumarium* L. (SHARIFI-RAD et al., 2015). Estudos com plantas que contém o composto limoneno como um dos seus constituintes químicos majoritários apontam para uma atividade antimicrobiana promissora frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e alguns fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*) com potencial para aplicações biomédicas (SHARIFI-RAD et al., 2015).

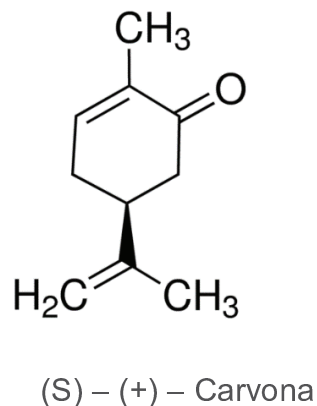
O composto limoneno tem sido estudado em modelos de depressão em roedores. Os resultados apontam que o composto administrado oralmente, a partir do óleo essencial extraído do limão, tem atividade semelhante aos antidepressivos convencionais em ratos em todas as doses ensaiadas (HAO et al., 2013). Em outro estudo os autores concluíram que a administração de limoneno foi capaz de aumentar

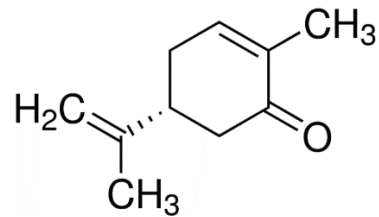
as concentrações do ácido gama-aminobutírico (GABA) e reduzir a de glutamato em ratos (ZHOU; YOSHIOKA; YOKOGOSHI, 2009), fato que sugere um efeito ansiolítico para este composto no sistema nervoso central. Em outra frente de estudo o terpeno mostrou-se hábil na inibição do fator de liberação de corticotropina, o qual está envolvido em processos de ansiedade de depressão (BANSOD et al., 2012). Segundo a literatura, muitos óleos essenciais, devido a sua lipossolubilidade, conseguem penetrar através da barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central denotando uma importante e potencial atividade biológica para este composto frente as doenças relacionadas a este sistema (SILVA, C. P, 2005).

## 2.7 CARVONA

A carvona (*p*-mentha-6,8-dien-2-one) é um monoterpene cetônico insaturado e devido a presença de um centro quiral pode ser biossintetizada em dois enantiômeros, figura 6, R – (-) – ou S – (+) carvona por algumas espécies vegetais (PEIXOTO et al., 2015).

**Figura 6: Representação das estruturas químicas dos isômeros do composto carvona.**





(R) – (–) – Carvona (continuação)

O composto carvona é encontrado como principal constituinte do óleo essencial de várias espécies vegetais como a *Mentha spicata* L (KEDIA et al., 2014), *Mentha piperita* (DE SOUSA BARROS et al., 2015), *Anethum graveolens* L, *Carum carvi* L.e *Lippia alba* (GONÇALVES et al., 2010; PEIXOTO et al., 2015).

Estudos com óleos essenciais das espécies *Mentha piperita* e *Mentha spicata* ricas no composto carvona demonstram forte atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (DE SOUSA BARROS et al., 2015). Essa enzima participa de importantes processos fisiológicos em animais e humanos. A inibição da acetilcolinesterase é uma estratégia farmacológica para potencializar a transmissão colinérgica (RANG, H. P. et al., 2007; VENTURA et al., 2010). Dentre as aplicações clínicas dos fármacos inibidores da acetilcolinesterase comercialmente disponíveis está o tratamento de doenças como o Alzheimer, glaucoma e miastenia *gravis* (RANG, H. P. et al., 2007).

Outras ações do composto carvona estão relacionadas à atividade acaricida para as larvas do carrapato (*Rhipicephalus microplus*) o qual ataca o rebanho bovino e ocasiona sérios prejuízos à pecuária nacional (PEIXOTO et al., 2015). Destaca-se ainda os estudos biológicos com a utilização da carvona que tem demonstrado que o composto possui atividade analgésica reduzindo a dor através da redução da excitabilidade neuronal (GONÇALVES et al., 2010). Frente aos fungos, estudos que utilizaram o óleo de plantas cujo principal constituinte é o composto carvona

demonstraram que o mesmo é capaz de inibir a produção de aflotoxina B1 produzida pela espécie fúngica *Aspergillus flavus* (KEDIA et al., 2014).

## 2.8 ANTIOXIDANTES E AS ESPÉCIES REATIVAS

A instalação de um processo oxidativo se dá devido a uma promoção de um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes em prol dos primeiros (BARBOSA et al., 2010). Os radicais livres são os agentes pró-oxidantes produzidos naturalmente pelos organismos vivos através das reações normais do metabolismo, por processos patológicos ou ainda durante as reações de eliminação de xenobióticos (KEHRER et al., 2015). No caso dos alimentos, as hidrólises e as reações de oxidação podem alterar de modo indesejável as características de produtos que contém óleos e gorduras durante os processos de obtenção e estocagem ocasionando perdas consideráveis (MORAIS et al., 2006a). Neste sentido, os processos oxidativos danosos tanto à saúde quanto à indústria podem ser inibidos pelo aporte exógeno de antioxidantes. Na medicina, diversos antioxidantes podem ser usados através da suplementação dietética com destaque às vitaminas do complexo E ( $\alpha$ -tocoferol), A (retinol e demais carotenoides) e C (ácido ascórbico), os quais estão associados à prevenção de diversas doenças (BONI et al., 2010). No caso da indústria alimentícia, de bebidas e cosmeceutica, os são empregados os antioxidantes sintéticos butilato de hidroxitolueno (BHT) e butilato de hidroxinisol (BHA) (ANDRADE et al., 2012; MORAIS et al., 2006a). De grande relevância é o fato de que os antioxidantes usados pela medicina tais como a vitamina C, ômega 3, 6 e 9 e carotenoides advém de fontes naturais com boa tolerabilidade e segurança à espécie humana. Por outro lado, o

contrário acontece com aqueles usados pela indústria, tais como, BHA e BHT os quais estão relacionados com toxicidade e carcinogenicidade (ANDRADE et al., 2012).

No que diz respeito aos estudos com a atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas, há relatos de busca por compostos com aplicação na medicina e nos processos industriais. Alguns autores têm buscado nos óleos essenciais fontes de conservação com aplicação na indústria de alimentos (CANSIAN et al., 2010; MORAIS et al., 2006b; SINGH et al., 2010; WANG et al., 2008). Todos estes estudos apontam para um mesmo objetivo, a saber, a substituição dos antioxidantes químicos usados pelas indústrias de alimentos os quais estão relacionados a toxidade a sérios danos à saúde humana (EBRAHIMABADI et al., 2010). Em outras frentes de estudo, pesquisadores objetivam a busca por compostos antioxidantes capazes de atuar na sequestro de radicais livres em processos patológicos relacionados ao câncer, aterosclerose, cirrose e doenças reumáticas (MORAIS et al., 2006b). Independentemente da aplicação, o ponto de convergência das pesquisas é a busca de compostos de origem vegetal aptos a neutralizar a ação dos radicais livres.

Os antioxidantes sintéticos são rotineiramente usados na conservação de alimentos especialmente aqueles ricos em óleos e gorduras promovendo proteção contra a oxidação. Os antioxidantes BHT e BHA são amplamente utilizados na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica, entretanto, devido a sua alta volatilidade e instabilidade associada aos indícios de toxicidade há na atualidade uma tendência a rejeição dos consumidores a estes compostos sintéticos (LOBO et al., 2010).

A busca por antioxidantes naturais desponta como uma alternativa promissora para substituir os antioxidantes sintéticos somado a um crescente interesse dos consumidores em ingredientes funcionais obtidos de fontes naturais. Desta forma, a

aplicação dos óleos essenciais nas indústrias de alimentos, bebidas, produtos de higiene pessoal e cosmética destaca-se como uma possibilidade viável para substituir os antioxidantes sintéticos e os antimicrobianos convencionais (MIRANDA et al., 2016).

Alguns estudos com óleos essenciais já têm demonstrado resultados promissores. Um exemplo é o óleo essencial da espécie medicinal *Rosmarinus officinalis* L. cujo principal constituinte é o 1,8 – cineol. Nesse estudo demonstrou-se que o óleo essencial bruto dessa espécie possui maior atividade antioxidante do que o composto majoritário testado isoladamente, candidatando-se a se tornar um aditivo alimentar de origem natural (WANG et al., 2008). Destaca-se desta forma que muitas vezes, a ação biológica de um óleo essencial é devida a soma dos seus constituintes químicos atuando concomitantemente, dificultando a atribuição desta função somente à ação do composto majoritário (WANG et al., 2008). Portanto, a constituição química de cada óleo essencial é de suma importância para o aparecimento ou não da ação farmacológica. No intuito da conservação, os óleos com atividade antioxidante e antimicrobianas convergentes mostram-se os mais promissores (ANDRADE et al., 2012).

## 2.9 ÓLEOS ESSENCIAIS E A PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS

A atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies vegetais tem sido explorada por diversos autores (AGGARWAL et al., 2002; BRITO et al., 2015; DE SOUSA BARROS et al., 2015; KEDIA et al., 2014; SINGH et al., 2010). Este crescente interesse pela busca por novos agentes antifúngicos está atrelado a pelo menos dois fenômenos. O primeiro refere-se às atividades biológicas que os óleos essenciais

desempenham nas plantas, as quais estão relacionadas a defesa frente ao ataque de agentes patogênicos (SIMÕES et al., 2016). O segundo, relaciona-se com o aumento dramático no número de cepas fúngicas resistentes aos agentes antimicrobianos usados na clínica médica (MÉNDEZ-TOVAR et al., 2007; MICELI; LEE, 2011; PEREA; PATTERSON, 2002; RAJENDRAN et al., 2015). Dessa forma, a procura por moléculas com potencial antifúngico reflete a uma iminente necessidade da sociedade contemporânea. A descoberta de cepas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans* que expressam resistência frente aos fármacos cetoconazol e fluconazol tem sido relatada na literatura (MÉNDEZ-TOVAR et al., 2007). Outros agentes fúngicos de grande interesse médico como: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* têm sido igualmente relatados como resistentes a múltiplos fármacos usados na prática médica (PEREA; PATTERSON, 2002). Cabe destacar que os fungos do gênero *Trichophyton* estão entre os principais agentes causadores de micoses superficiais as quais acometem boa parcela da população (MANZANO-GAYOSSO et al., 2015). Diferentes autores têm investigado as ações antifúngicas de diversos óleos essenciais obtidos dos mais diversos gêneros vegetais (KEDIA et al., 2014; MAREI; ABDEL RASOUL; ABDELGALEIL, 2012; SHARIFI-RAD et al., 2015; SINGH et al., 2010). Muitos destes trabalhos têm associado a pesquisa das atividades antifúngicas dos óleos essenciais à incorporação a sistemas nanoestruturados (BEYKI et al., 2014; DANIELLI et al., 2013; KHALILI et al., 2015; MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015). A aplicação da nanotecnologia a pesquisa com os óleos essenciais está relacionada à prevenção da volatilização imediata (FLORES et al., 2011), à sustentação da liberação em razão do tempo (MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015), e a uma



melhor solubilização em meios aquosos (BEYKI et al., 2014; KHALILI et al., 2015). Ainda, pode ser usada como uma estratégia para superar os mecanismos de resistência expressos por alguns microrganismos (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Em relação aos agentes antibacterianos duas entre as aplicações importantes dos óleos essenciais podem ser destacadas. A primeira diz respeito a busca de compostos químicos que possam servir diretamente ou como molde para a prospecção de moléculas aptas a inibir ou eliminar as bactérias de interesse biomédico e veterinário (MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016). A segunda aplicação refere-se à inibição de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos e a segurança alimentar (ANDRADE et al., 2012). Diversos autores têm buscado em suas pesquisas prospectar nos óleos essenciais moléculas ativas frente a diferentes microrganismos relacionados aos processos patológicos em humanos, em animais e na deterioração de alimentos (CANSIAN et al., 2010; EBRAHIMABADI et al., 2010; MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016). Todas essas pesquisas refletem uma necessidade contemporânea por novos compostos com vistas a melhorar o arsenal terapêutico considerando os crescentes relatos de resistência bacteriana frente aos antibióticos convencionais (ANDRADE et al., 2012).

## 2.10 SISTEMAS COLOIDAIS E NANOEMULSÕES

Sistemas coloidais têm sido amplamente utilizados pela indústria alimentar e farmacêutica e incluem uma ampla variedade de moléculas com diferentes atributos funcionais, tais como triglicerídeos, lipídios bioativos, óleos cítricos, óleos essenciais, fitoesteróis, carotenoides, vitaminas insolúveis e demais substâncias lipofílicas os quais podem ser dispersos em meios aquosos (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). Os três principais sistemas coloidais empregados pela indústria alimentar e

farmacêutica são denominados emulsões, microemulsões e nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2011). A utilização comercial de cada um desses sistemas coloidais apresenta vantagens e desvantagens. As microemulsões e nanoemulsões contêm pequenas partículas que dispersam a luz fracamente e portanto tendem a ser opticamente transparentes ou ligeiramente turvas (MCCLEMENTS, 2011). Estes dois tipos de sistemas coloidais quando formulados com sucesso apresentam boa estabilidade, pouca tendência a separação gravitacional de suas partículas e baixo potencial para agregação devido ao pequeno tamanho das suas partículas. Uma vez que a formação das microemulsões é termodinamicamente conduzida, a sua existência é governada por variáveis termodinâmicas intrínsecas e extrínsecas, tais como temperatura, pressão e concentração. Porém, as microemulsões podem tornar-se instáveis caso estas variáveis mudem durante o processamento, embalagem, transporte, armazenamento ou no ponto de venda (MCCLEMENTS, 2011).

Por outro lado, as emulsões são formadas por gotículas relativamente grandes que dispersam a luz intensamente e por isso elas tendem a ser opticamente opacas ou altamente turvas, o que é desejável para algumas aplicações e indesejável para os outras (MCCLEMENTS, 2011). Portanto as emulsões tendem a ser mais estáveis frente a separação gravitacional e a agregação das partículas. Contudo, a quantidade de agentes tensioativos necessários para formar emulsões estáveis é em geral consideravelmente menor do que a requerida para formar as microemulsões e nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2011)

As nanoemulsões são uma classe de emulsões com tamanhos de partículas contidos na escala manométrica, tipicamente numa escala de 50 a 500 nanômetros embora não haja na comunidade científica um consenso sobre este ponto (BILBAO-SAINZ et al., 2010; FORGIARINI et al., 2001). Há, portanto, uma dificuldade em

conceituar com exatidão a faixa de tamanho de partículas que caracterizam uma nanoemulsão. Para alguns autores as nanoemulsões são dispersões cujas gotículas se estendem na faixa entre 100 e 600 nanômetros (BOUCHEMAL et al., 2004), enquanto que outros restringem esse tamanho a faixa de 20 a 200 nanômetros (SOLANS et al., 2005).

As nanoemulsões sendo sistemas de não equilíbrio não podem ser formadas espontaneamente, conseqüentemente é necessário o aporte de energia por dispositivos mecânicos ou do potencial químico dos seus componentes para que possam ser obtidas (SOLANS et al., 2005). Estes sistemas podem contribuir para incrementar a dispersabilidade de compostos lipofílicos em água e conseqüentemente aumentar sua biodisponibilidade durante a fase farmacocinética da absorção (BILBAO-SAINZ et al., 2010). Outra vantagem refere-se a possibilidade de produzir sistemas a partir de compostos imiscíveis entre si (FORGIARINI et al., 2001). Destaca-se ainda que outro benefício das nanoemulsões frente às emulsões típicas refere-se à concentração de tensoativos na formulação. Enquanto as emulsões geralmente requerem uma concentração de tensoativos de cerca de 20% do volume final, as nanoemulsões podem ser obtidas com concentrações entre 3 e 10% (BOUCHEMAL et al., 2004).

Em relação à aplicação de nanoemulsões em estudos de possíveis melhorias das atividades biológicas dos compostos do metabolismo secundário dos vegetais, há muitas possibilidades potencialmente aplicáveis. Em vários aspectos a proteção dos componentes funcionais dos óleos essenciais podem oferecer vantagens quando incorporados a um sistema nanoemulsionado. Destaca-se primeiramente a proteção e a melhoria da estabilidade físico-química dos óleos, assim como uma melhoria

considerável das suas atividades antimicrobianas nas mais variadas aplicações industriais como fonte de conservantes naturais (DONSÌ; FERRARI, 2016).

As nanoemulsões obtidas com o óleo essencial da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis* demonstraram importante atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* (DUARTE et al., 2015). Frente a atividade antifúngica para óleo essencial de *Stenachaenium megapotamicum* foi demonstrado incremento da atividade para o sistema nanoemulsionado quando comparado ao sistema livre (DANIELLI et al., 2013). Para a atividade antibacteriana, extraído do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi demonstrado aumento da atividade frente aos isolados testados, demonstrando que o sistema emulsionado foi capaz de reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) para estes organismos (SAGAVE et al., 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Frente ao exposto, este trabalho visou desenvolver nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Poiretia latifolia* Vogel e seus constituintes majoritários carvona e/ou limoneno e avaliar as atividades antioxidantes, antibacteriana e antifúngica do óleo e das formulações obtidas.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar qualitativamente e quantitativamente os compostos químicos presentes no óleo essencial da espécie *P. latifolia* em seus diferentes estádios de desenvolvimento vegetal;
- Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos compostos majoritários carvona e/ou limoneno presentes no óleo essencial identificados na espécie;
- Desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão produzida pelo método de inversão de fases contendo o óleo essencial bruto da espécie *P. latifolia*.
- Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo os compostos carvona e/ou limoneno produzidas pelo método de inversão de fases comparando suas atividades biológicas com aquela que incorpora o óleo bruto da espécie *P. latifolia*;
- Determinar o perfil de atividade antioxidante do óleo essencial bruto, dos compostos carvona e/ou limoneno e das respectivas nanoemulsões produzidas pelos métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- Determinar o potencial perfil antifúngico e antibacteriano do óleo essencial bruto da espécie *P. latifolia*, dos compostos carvona e/ou limoneno e das respectivas nanoemulsões frente a isolados de interesse biomédico.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Illinois: Allured, 2009.

AGGARWAL, K. K. et al. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 59–63, 1 jan. 2002.

ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G; HOWARD, C. A. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de Fármacos**. 9. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319–327, out. 2007.

AMORIM, C. C. Espécies vegetais utilizadas na medicina campeira na região da Coxilha Rica e estudo da erva-de-touro (*Poiretia latifolia*) Lages - SC 2010. 15 dez. 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399–408, jun. 2012.

ARAÚJO, F. M. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana* C. Müller (Papilionoideae-Leguminosae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 10, p. 1805–1810, 2009.

AZEEM, A. et al. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 69–76, 16 jan. 2009.

BANSOD et al. Limonene attenuates anxiogenic - and depression-like effects of corticotropin-releasing factor in mice. **Ph Tech Med**, v. 1, n. 6, p. 214–220, dez. 2012.

BARATTA, M. T. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 235–244, 1 jul. 1998.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BEYKI, M. et al. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 310–319, mar. 2014.

BILBAO-SAINZ, C. et al. Nanoemulsions Prepared by a Low-Energy Emulsification Method Applied to Edible Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11932–11938, 24 nov. 2010.

BONI, A. et al. Antioxidant vitamins and prevention of atherosclerosis in childhood. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 4, p. 373–380, dez. 2010.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 6 ago. 2004.

BOUWMEESTER, H. J. et al. Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. **Plant Physiology**, v. 117, n. 3, p. 901–912, jul. 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.

BRASIL. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. . 2006.

BRASIL. Portaria 2.960 de 09 de dezembro de 2008. . 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**, 2009.

Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)>

BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: [s.n.].

BRASIL. **Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira**. 1. ed. ed. Brasília: [s.n.].

BRITO, D. I. V. et al. Phytochemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and of the Thymol against *Candida* strains. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 836–844, 2015.

CANSIAN, R. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*) essential oil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 2, p. 378–384, jun. 2010.

CLÁUDIA SIMÕES et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Universidade, 1999.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard, M38-A2**. Wayne: CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, M27-A3**. Wayne: CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

DANIELLI, L. J. et al. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 23–28, out. 2013.

DE SOUSA BARROS, A. et al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 557–564, 15 dez. 2015.

DONAZZOLO et al. Viabilidade de sementes de *Poiretia latifolia* Vogel. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, nov. 2013.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 10 set. 2016.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189–192, mar. 2015.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 452–458, 15 mar. 2010.

**Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 2

FERNANDES, E.; SOUSA, M. J.; DIAS, A. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils from the Brazilian plants *Acritopappus confertus*, *Cuphea carthagenensis* and *Poiretia bahiana*. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. P2065, out. 2014.

FERNANDES, PATRÍCIA et al. Caracterização do habitat da erva-de-touro nos Campos naturais de altitude do Planalto Serrano Catarinense, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 7, n. 6, 2 dez. 2011.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3999–4003, 1 nov. 2002.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

FORGIARINI, A. et al. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, 1 abr. 2001.

GOMES, M. DE S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do Gênero Citrus e de seus componentes majoritários**. Tese de Doutorado. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4464/1/TESE\\_Atividades%20biol%C3%B3gicas%20dos%20%C3%B3leos%20essenciais%20de%20tr%C3%AAs%20esp%C3%A9cies%20do%20g%C3%AAnero%20Citrus%20e%20de%20seus%20componentes%20majorit%C3%A1rios.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4464/1/TESE_Atividades%20biol%C3%B3gicas%20dos%20%C3%B3leos%20essenciais%20de%20tr%C3%AAs%20esp%C3%A9cies%20do%20g%C3%AAnero%20Citrus%20e%20de%20seus%20componentes%20majorit%C3%A1rios.pdf)>.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal**. 2. ed. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2011.

GONÇALVES, J. C. R. et al. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, n. 1–3, p. 108–112, 25 out. 2010.

HAO, C.-W. et al. Antidepressant-like effect of lemon essential oil is through a modulation in the levels of norepinephrine, dopamine, and serotonin in mice: Use of the tail suspension test. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 370–379, jan. 2013.

JANKE, H.; OLIVEIRA, M. DE L.; SIQUEIRA, N. C. O gênero *Poiretia* Vent. (Leguminosae-Faboideae) no Rio Grande do Sul – taxonomia e aspectos farmacognósticos. **Iheringia. Sér. Bot.**, v. 38, p. 43–66, 1 nov. 1988.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1–2, p. 150–163, 1 maio 2008.

KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 29–36, abr. 2014.

KEHRER, J. P. et al. Free Radicals and Reactive Oxygen Species☆. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2015.



- KHALILI, S. T. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 502–508, jan. 2015.
- KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, maio 2004.
- KÜLKAMP, I. C. et al. Nanoencapsulation Improves the In Vitro Antioxidant Activity of Lipoic Acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 4, p. 598–607, 1 ago. 2011.
- LACHAMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2
- LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.
- LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732–1738, maio 2008.
- MANZANO-GAYOSSO, P. et al. Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos. **Revista mexicana de micología**, v. 41, p. 47–53, 2015.
- MAREI, G. I. K.; ABDEL RASOUL, M. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 56–61, maio 2012.
- MATTOS, L. M. et al. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema beta-caroteno/ácido linoléico. **Comunicado Técnico**, 2009.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 7 mar. 2011.
- MÉNDEZ-TOVAR, L. J. et al. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 4, p. 320–322, 1 dez. 2007.
- MICELI, M. H.; LEE, S. A. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e666-678, nov. 2011.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213–220, mar. 2016.
- MIYAGUSKU, L. et al. Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 45–49, 2007.
- MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 28, p. 73–80, mar. 2015.
- MONTIRONI, I. D.; CARIDDI, L. N.; REINOSO, E. B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 3, p. 210–216, jul. 2016.

MORAIS, S. M. DE et al. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907–910, out. 2006a.

MORAIS, S. M. DE et al. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907–910, out. 2006b.

MUKHERJEE, P. K. et al. Clinical Trichophyton rubrum Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82–86, jan. 2003.

MULLER, C. **Revisão taxonomica do genero Poiretia vent. (leguminosae) para o Brasil**. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000051838>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

NASCIMENTO, E. M. et al. Poisoning by Poiretia punctata in cattle and sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 963–966, out. 2014.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95–102, 15 dez. 2012.

PAIM, L. F. N. A. et al. Assessment of plant development, morphology and flavonoid content in different cultivation treatments of Calendula officinalis L.: Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 974–980, dez. 2010.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from Lippia alba genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against Rhipicephalus microplus. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, 30 maio 2015.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Nanotechnology and drug resistance. v. 65, n. 13–14, p. 1803–1815, 30 nov. 2013.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 35, n. 9, p. 1073–1080, 1 nov. 2002.

PINHO, C. et al. In vitro anti-cancer activities of Poiretia bahiana and Acritopappus confertus. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. P2B111, out. 2014.

PORTO, C. et al. (R)-(-)-carvone and (1R, 4R)-trans-(+)-dihydrocarvone from poiretia latifolia vogel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 782–786, 2010.

RADAELLI, M. et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against Clostridium perfringens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424–430, jun. 2016.

RAJENDRAN, R. et al. Prior in vitro exposure to voriconazole confers resistance to amphotericin B in Aspergillus fumigatus biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 3, p. 342–345, set. 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, maio 2001.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 17, n. 2, p. 267–277, jun. 2016.

ROYER, L. A. J. **MORFOANATOMIA, ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE POIRETIA TETRAPHYLLA (POIRET) BURKART (LEGUMINOSAE)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SAGAVE, L. et al. Melaleuca alternifolia activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against Rhodococcus equi isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221–226, fev. 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547–556, jan. 2015.

SÃO PEDRO, A. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, p. 1364–1374, 2013.

SHARIFI-RAD, J. et al. Phytochemical Compositions and Biological Activities of Essential Oil from Xanthium strumarium L. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7034–7047, 17 abr. 2015.

SIANI ANTONIO CARLOS et al. Óleos essenciais. **Biotecnologia, Ciência de Desenvolvimento**, v. 76, p. 38–43, 2000.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla: Estudos dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares**. Santa Maria, 2005.

SIMÕES et al. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed.- ed. Florianópolis: Edda UFSC ; Porto Alegre, 2000.

SINGH, P. et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1734–1740, jun. 2010.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, out. 2005.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed.- ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013.

**Técnica de determinação do tamanho de partículas por difração laser**. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/products/technology/laser-diffraction/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

VELÁZQUEZ-ACOSTA, C. et al. Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. **Salud Pública de México**, v. 58, n. 4, p. 446–452, ago. 2016.

VENTURA, A. L. M. et al. Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, n. 2, p. 66–72, 2010.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1019–1022, 1 jun. 2008.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 360–365, 15 set. 2012.

WHO. **Declaração de Alma Ata**. URSS: Setembro 1978

WILLIAN C. E; EVANS DAPHNE. **Pharmacognosy**. London: [s.n.]. v. 16

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Genebra: WHO, 1999. v. 1

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Genebra: WHO, 2004. v. 2

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Genebra: WHO, 2007. v. 3

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Genebra: WHO, 2009. v. 4

ZAH, 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.

ZHANG, Y. et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 1 jan. 2014a.

ZHANG, Z. et al. Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 150, p. 307–312, 1 maio 2014b.

ZHOU, W.; YOSHIOKA, M.; YOKOGOSHI, H. Sub-chronic effects of s-limonene on brain neurotransmitter levels and behavior of rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 55, n. 4, p. 367–373, ago. 2009.