

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Potencial biológico e nanotecnológico do óleo volátil de espécies de *Stenachaenium*
Benth. nativas do Rio Grande do Sul

LETÍCIA JACOBI DANIELLI

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Potencial biológico e nanotecnológico do óleo volátil de espécies de *Stenachaenium*
Benth. nativas do Rio Grande do Sul

Dissertação apresentada por **Letícia Jacobi Danielli** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20 de março de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Danielli, Letícia Jacobi
Potencial biológico e nanotecnológico do óleo volátil de espécies de *Stenachaenium* Benth. nativas do Rio Grande do Sul / Letícia Jacobi Danielli. -- 2013.
128 f.

Orientadora: Miriam Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Gênero *Stenachaenium*. 2. Óleo volátil. 3. Atividades biológicas. 4. Nanoemulsão. I. Apel, Miriam Anders, orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia, Micologia Aplicada e Nanotecnologia, e na Central Analítica 2 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com os Professores Dra. Irene Guerreiro Kulkamp e Dr. Alexandre Fuentesfria.

Agradecemos aos professores citados pela colaboração e a CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
pelo amor e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Miriam Anders Apel pela confiança depositada, ensinamentos, compreensão, dedicação e amizade.

Aos professores Dra. Irene Kùlkamp e Dr. Alexandre Fuentefria pela disponibilidade e fundamentais contribuições para o desenvolvimento de todo o trabalho.

Ao botânico Dr. Sérgio L. Bordignon, pela colaboração na coleta e identificação do material vegetal estudado.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia, pelo acolhimento, apoio, colaboração e pela amizade.

Às alunas de Iniciação Científica, Monique e Renatha, pela amizade, colaboração e comprometimento.

Às colegas Mariana Bianchini, Joana Forgearini e Graziela Camargo pela importante ajuda.

Aos meus amigos, em especial em especial à Ticiano, Lara, Moara e Adão Lauro, por todo apoio e acolhimento.

Aos meus pais e minhas irmãs, que sempre torceram pelo meu sucesso e por estarem sempre ao meu lado. Pelo amor, pelo carinho, pelo exemplo, por tudo que me ensinaram e que fizeram por mim.

“Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinha, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.”

Autor desconhecido

RESUMO

Inúmeras pesquisas têm evidenciado importantes atividades biológicas provenientes de óleos voláteis e seus constituintes. Entretanto, estes compostos apresentam-se como misturas complexas, caracterizadas por sua volatilidade e instabilidade. Por esta razão, é crescente a investigação de sistemas nanoparticulados atuando como carreadores destes compostos, com a finalidade de estabilizar a volatilidade do óleo. Partindo desse pressuposto, a presente proposta objetivou avaliar química e biologicamente o óleo volátil de espécies do gênero *Stenachaenium* Benth. nativas do Rio Grande do Sul, cuja família botânica, Asteraceae, é conhecida pela produção dessa classe de metabólitos e escassos são os estudos na literatura especializada com relação à fitoquímica ou atividades biológicas relacionadas às espécies deste gênero. Assim, obteve-se, pelo método de hidrodestilação, o óleo volátil de folhas e flores de *S. adenanthum*, *S. macrocephalum*, *S. megapotamicum* e *S. riedelli*. A análise química, realizada por CG/MS, identificou 64 compostos nas diferentes amostras de óleo volátil, demonstrando grande variabilidade entre as espécies, onde *S. adenanthum* e *S. megapotamicum* exibiram importante presença de sesquiterpenos, enquanto que para as demais houve predominância de compostos alifáticos. O óleo de *S. megapotamicum* propiciou o desenvolvimento de nanoemulsões, pela técnica de emulsificação espontânea, que foram avaliadas em ensaios biológicos em comparação ao óleo livre. Com relação à atividade antifúngica, determinada pela técnica de microdiluição em caldo, as amostras de *S. megapotamicum* e *S. riedelli* demonstraram atividade contra dermatófitos. Todas as amostras, exceto a espécie *S. adenanthum*, exibiram inibição significativa da migração leucocitária em relação ao controle, avaliada no ensaio de antiquimiotaxia. Apenas os óleos voláteis das espécies *S. megapotamicum* e *S. riedelli* apresentaram atividade antioxidante pelo ensaio de TBARS. O sistema nanoemulsionado potencializou significativamente o efeito antifúngico do óleo. Assim, os óleos voláteis, principalmente de *S. megapotamicum* e *S. riedelli*, podem ser considerados promissores para o tratamento de infecções por dermatófitos, com o benefício do efeito antiquimiotáxico e antioxidante.

Palavras chave: *Stenachaenium*, óleo volátil, nanoemulsão, atividade antioxidante, atividade antiquimiotáxica, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Biological and nanotechnological potential of volatile oil of Stenachaenium Benth. species native from Rio Grande do Sul

Several studies have demonstrated the biological activities of volatile oils and their constituents. However, this group of compounds is a complex mixture, characterized by its instability and volatility. For this reason, researches with nanoparticulate systems have been developed, aiming to obtain carriers for these compounds, in order to stabilize the oil volatility. Taking this into account, this study aims to evaluate chemically and biologically the volatile oil of species of *Stenachaenium* Benth. genus native from Rio Grande do Sul, which botanical family, Asteraceae, is known for the production of this class of metabolites. In fact, there are just a few reports in the literature regarding to the chemical or biological activities related to the species of this genus. The volatile oil was obtained from leaves and flowers of *S. adenanthum*, *S. macrocephalum*, *S. megapotamicum* and *S. riedelli*, by hydrodistillation. By chemical analysis using GC/MS, 64 compounds were identified in the different samples, demonstrating the great variability among the species. *S. adenanthum* and *S. megapotamicum* exhibited significant presence of sesquiterpenes, while aliphatic compounds were predominant in the other species. The nanoemulsion was developed with the volatile oil of *S. megapotamicum* by spontaneous emulsification technique and was subjected to biological assays in comparison with free oil. Regarding to the antifungal activity, assessed by broth microdilution, the samples of *S. megapotamicum* and *S. riedelli* demonstrated effect against dermatophytes. Except for *S. adenanthum*, all the species exhibited significant inhibition of leukocyte migration compared to control, when evaluated by antichemotactic assay, through of the Boyden chamber. Only the volatile oil of *S. megapotamicum* and *S. riedelli* showed antioxidant activity by TBARS assay. The nanoemulsion significantly improved the effect of free oil in the assay of antifungal activity. Thus, the volatile oil, particularly of *S. megapotamicum* and *S. riedelli* may be considered promising for the treatment of dermatophytes infections, with the benefit of antichemotactic and antioxidant effect.

Keywords: *Stenachaenium*, volatile oil, nanoemulsion, antioxidant activity, antichemotactic activity, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Rota biossintética dos terpenoides	37
Figura 2.	Representação de algumas subfamílias de monoterpenos	39
Figura 3.	Estruturas representativas dos principais subgrupos de sesquiterpenos	40
Figura 4.	Rrepresentação esquemática de cipsela da espécie <i>Stenachaenium megapotamicum</i>	43
Figura 5.	Diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth.	68
Figura 6.	Cromatogramas obtidos por CG/EM para análise da composição química do óleo volátil das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth.	70
Figura 7.	Estrutura química dos principais compostos identificados no óleo volátil das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth	76
Figura 8.	Via de formação de sesquiterpenos a partir de pirofosfato de farnesila para o óleo volátil de <i>Pogostemon cablin</i>	78
Figura 9.	Espectro de massas do composto 2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi), obtido por CG/EM	80
Figura 10.	Possibilidades de fragmentação do derivado cumarínico 2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Listagem das espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth. coletadas, informações de local, período de coleta e número de registro do Herbário ICN.....	67
Tabela 2.	Material vegetal extraído, rendimento e aspecto dos óleos voláteis obtidos das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth.	67
Tabela 3.	Composição percentual dos constituintes dos óleos voláteis obtidos das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth.....	72
Tabela 4.	Características das nanoemulsões utilizadas nos ensaios biológicos	82
Tabela 5.	Screening contra fungos filamentosos e leveduriformes do óleo volátil das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> Benth. e timol	85
Tabela 6.	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo volátil de <i>Stenachaenium megapotamicum</i> (SME/11), nanoemulsão e timol contra dermatófitos	86
Tabela 7.	Efeito do óleo volátil das diferentes espécies de <i>Stenachaenium</i> e da nanoemulsão de <i>S. megapotamicum</i> na quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares <i>in vitro</i> em relação ao LPS	93
Tabela 8.	Inibição da peroxidação lipídica das amostras de óleo volátil das diferentes espécie de <i>Stenachaenium</i> , através do método de TBARS	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFM	Concentração fungicida mínima
CG/MS	Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standart Institute
DAMPP	Difosfato de dimetilalila
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazila
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPP	Pirofosfato de geranila
IL	Interleucina
IPP	Difosfato de isopentanila
IV	Infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MEP	Metileritritol fosfato
NO	Nitric oxide (óxido nítrico)
PGs	Prostaglandinas
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAD	<i>S. adenanthum</i>
SMA	<i>S. macrocephalum</i>
SME	<i>S. megapotamicum</i>
SME/11	<i>S. megapotamicum</i> - coleta de 2011
SME/12	<i>S. megapotamicum</i> - coleta de 2012
SRI	<i>S. riedelli</i>
SRI/F	<i>S. riedelli</i> - folhas
SRI/FI	<i>S. riedelli</i> - folhas coletadas no período de inflorescência
SRI/I	<i>S. riedelli</i> - inflorescência
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TBA	Thiobarbituric acid (ácido tiobarbitúrico)
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TNF	Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1 OBJETIVOS	31
1.1 Objetivo geral	33
1.2 Objetivos específicos	33
2 REVISÃO DA LITERATURA	35
2.1 Óleos voláteis	37
2.1.1 Terpenoides	38
2.1.1.1 Monoterpenos	40
2.1.1.2 Sesquiterpenos	42
2.1.2 Propriedades biológicas	43
2.2 Considerações sobre a Família Asteraceae	44
2.2.1 Considerações sobre o gênero <i>Stenachaenium</i> Benth.	44
2.2.2 Atividades biológicas de óleos voláteis de espécies da Família Asteraceae	47
2.3 Atividades Biológicas	47
2.3.1 Atividade antimicrobiana	48
2.3.1.1 Atividade antidermatofítica	49
2.3.2 Atividade antiquimiotóxica	50
2.3.3 Atividade antioxidante	51
2.3.3.1 Reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	52
2.3.3.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	52
2.4 Sistemas nanoparticulados	53
2.4.1 Nanoemulsões	53
2.4.2 Sistemas nanoparticulados contendo óleo volátil	54
2.4.3 Método de emulsificação espontânea	55
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3. 1 Material vegetal	59
3.2 Obtenção do óleo volátil	59
3.3 Análise química do óleo volátil	59
3.4 Desenvolvimento da nanoemulsão contendo óleo volátil de <i>Stenachaenium megapotamicum</i>	60
3.5 Caracterização da nanoemulsão	61
3.5.1 Aspectos macroscópicos	61
3.5.2 Determinação do pH	61
3.5.3 Determinação do tamanho da partícula e índice de polidispersão	61
3.5.4 Determinação do teor de óleo volátil na nanoemulsão	62
3.6 Atividade antifúngica	62
3.6.1 Microrganismos	62
3.6.2 Obtenção do inóculo	62
3.6.3 <i>Screening</i>	63
3.6.4 Determinação da concentração inibitória mínima	63
3.6.5 Determinação da concentração fungicida mínima	
3.7 Atividade antiquimiotóxica	
3.8 Atividade antioxidante	65
3.8.1 Reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) por espectrofotometria	65
3.8.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	65

3.9 Análise estatística	66
3.10 Descarte de resíduos	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 Obtenção do óleo volátil	69
4.2 Análise química do óleo volátil	71
4.3 Desenvolvimento da nanoemulsão	83
4.5 Atividade antifúngica	87
4.6 Atividade antiquimiotóxica	93
4.7 Atividade antioxidante	99
CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	111

Os óleos voláteis constituem um importante grupo de metabólitos secundários de plantas caracterizados pela volatilidade e odor. Essas substâncias têm sido empregadas em larga escala nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica devido a efeitos biológicos correlacionados, tais como atividade antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (KAMATOU et al., 2007; KÖSE et al., 2010).

Essas propriedades podem ser muito importantes no contexto atual, visto que tem se observado que o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar ao aumento de microrganismos resistentes. Assim, tem sido frequente a busca de novas possibilidades para tratamento e profilaxia, principalmente na investigação de atividades farmacológicas de substâncias isoladas de plantas como alternativas terapêuticas efetivas contra resistência à terapia convencional (YU et al., 2011; CABRAL et al., 2013).

Entre essas substâncias encontram-se os terpenoides, compostos presentes nos óleos voláteis, cuja atividade antimicrobiana é conhecida por atuar em infecções cutâneas e de mucosas, e no trato respiratório (LOPES-LUTZ et al., 2008). A característica hidrofóbica destes compostos resulta em melhora na penetração da membrana celular do microrganismo, auxiliando na ação antimicrobiana dos seus componentes (OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010). Em associação à atividade antimicrobiana, muitos óleos apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CANDAN et al., 2003; BOUNATIROU et al., 2007; ĐORĐEVIĆ et al., 2007; SINGH et al., 2008; BAJPAI et al., 2009; AHMADI et al., 2010). Um composto com essas características auxilia de forma significativa na cicatrização de lesões, considerando que infecções desencadeiam um processo inflamatório, resultando na síntese de enzimas pró-inflamatórias através da ativação do sistema imune (WU; TEIK, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Para o tratamento, a combinação de ação anti-inflamatória e antifúngica tem a vantagem de limitar sintomas normalmente relacionados a infecções tópicas (HAVLICKOVA; FRIEDRICH, 2008).

Sabe-se ainda que o estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a produção de oxidantes, também está envolvido tanto em processos inflamatórios como em infecciosos (MASTELIC et al., 2008; JIA et al.,

2010). Substâncias antioxidantes podem atuar nessas condições reduzindo o dano tecidual causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e devido à sua propriedade redox, como doadores de hidrogênio e agentes redutores, modulando o processo de cicatrização (TEPE et al., 2005; BAJPAI et al., 2009; CHEN et al., 2009). Desta forma, substâncias que possuem atividade antibiótica, antioxidante e anti-inflamatória apresentam-se como potenciais nos processos de cicatrização.

Tais propriedades são relatadas tanto para o óleo volátil como para seus constituintes isolados. Contudo, por tratar-se de misturas complexas, quimicamente diversificadas, esses compostos são caracteristicamente instáveis e facilmente degradáveis. Com a finalidade de estabilizar a volatilidade do óleo e potencializar seu efeito, a utilização de nanopartículas como carreadores dessas substâncias tem sido intensamente investigada (PAULA et al., 2010; SANSUKCHAREARNPON et al., 2010; WEN et al., 2010).

Sistemas nanoparticulados são caracterizados por conter partículas de dimensões nanométricas, descritos como potencializadores do efeito de fármacos e diferentes substâncias. Isso ocorre devido a capacidade de carreamento de compostos até sítios de atuação mais específicos, melhora da eficácia e diminuição de possíveis efeitos indesejados. Apresentam-se, entre outras formas, como nanoemulsões, nanocápsulas ou lipossomas, de acordo com a sua composição química, estruturação física e propriedades apresentadas (LERTSUTTHIWONG et al., 2008, KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Um sistema nanoparticulado pode proteger a substância de ações do meio ambiente, melhorar a penetração intracelular em tecidos biológicos e a retenção cutânea, prolongar seu efeito, diminuir a irritabilidade tecidual devido à liberação lenta do composto, e, ainda, melhorar a especificidade, a tolerabilidade e a solubilidade. No caso dos óleos voláteis, traz ainda o benefício de diminuição da volatilização, com consequente redução da instabilidade e perda do material (PANDEY et al., 2005; LERTSUTTHIWONG et al., 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SANSUKCHAREARNPON et al., 2010).

Entre as famílias botânicas caracterizadas pela produção de óleos voláteis inclui-se a Asteraceae, conhecida por compreender espécies com importantes

efeitos biológicos, em especial por ação de componentes presentes nos óleos. Dos gêneros de ocorrência no Sul do Brasil selecionou-se *Stenachaenium* Benth. como objeto da presente proposta, pois, apesar de amplamente encontrado no estado do Rio Grande do Sul, escassos são os estudos na literatura especializada com relação à fitoquímica e atividades biológicas.

1.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a importância da identificação de novas substâncias com atividade antifúngica a fim de proporcionar alternativas terapêuticas efetivas, esse estudo objetivou a caracterização química, avaliação das atividades antioxidante, antiquimiotóxica e antifúngica do óleo volátil de quatro espécies de *Stenachaenium* Benth. nativas do Rio Grande do Sul: *Stenachaenium adenanthum* Krasch., *Stenachaenium macrocephalum* Benth. ex Benth. & Hook. f., *Stenachaenium megapotamicum* Baker e *Stenachaenium riedelli* Baker, bem como o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado contendo o óleo volátil.

1.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos óleos voláteis de folhas e inflorescências frescas, de espécies de *Stenachaenium* coletadas no Rio Grande do Sul, pelo método de hidrodestilação utilizando aparelho tipo Clevenger;
- Caracterização da composição química dos óleos voláteis obtidos pela técnica de cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM);
- Avaliação da atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduriformes, a partir dos óleos voláteis obtidos, pela técnica de microdiluição em caldo padronizada pelo Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI);
- Avaliação da atividade antiquimiotóxica *in vitro* dos óleos voláteis obtidos pelo método da câmara de Boyden;
- Avaliação da atividade antioxidante dos óleos voláteis obtidos através da reação com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) por espectrofotometria e

proteção de peroxidação lipídica pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

- Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo o óleo volátil da espécie *S. megapotamicum*;
- Avaliação das atividades antifúngica, antiquimiotáxica e antioxidante, pelos métodos citados, da nanoemulsão desenvolvida.

2.1 Óleos voláteis

Óleos voláteis são importantes metabólitos secundários de plantas, caracterizados como misturas complexas de substâncias voláteis, de baixo peso molecular, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, no entanto, instáveis e de fácil degradação (BAKKALI et al., 2008; SANSUKCHAREARNPON et al., 2010).

A composição química desses óleos apresenta diversos compostos com diferentes propriedades moleculares e físico-químicas que demonstram baixo peso molecular, baixa polaridade e alta volatilidade (ZIANI et al., 2011). A diversidade de grupos químicos pode variar desde aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos terpênicos, ésteres, éteres, cumarinas, fenóis até alcoois simples e terpênicos, no entanto, a formação dessa gama de compostos ocorre a partir da derivação química de terpenoides ou fenilpropanoides, e por esta razão, são agrupados em apenas duas classes. A classe terpênicica é formada de unidades de isopreno (constituídos de 5 carbonos), os quais originam-se pela via do ácido mevalônico e pela via do metileritritol fosfato. A classe fenilpropanoídica, conhecida também como aromática, é composta por derivados fenólicos, provenientes do metabolismo do ácido chiquímico, que apresenta estrutura básica constituída por três carbonos ligados a um anel benzoico (SANGWAN et al., 2001).

Com relação à localização, esses metabólitos podem ser extraídos de vários órgãos do vegetal, incluindo flores, sementes, raízes, rizomas, brotos, cascas, caules e frutos, por uma série de métodos (BURT, 2004). O processo de obtenção descrito como mais utilizado, é a técnica de hidrodestilação, no entanto, métodos como extração por solventes orgânicos, expressão, fluido de CO₂ supercrítico ou *enfleurage* também podem ser utilizados, variando a composição química, quantidade e concentração dos componentes obtidos conforme o método empregado. Também constituem fonte de variação junto com o método empregado, o órgão vegetal e a época de coleta do material de origem (MSAADA et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010; VIUDA-MARTOS et al., 2011). A identificação dos constituintes geralmente é realizada pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, relacionando

volatilidade e polaridade por meio do tempo de retenção do composto devido ao tipo de interação deste com a fase estacionária (MIGUEL, 2010).

2.1.1 Terpenoides

A classe terpenoidica apresenta-se com mais de 30.000 compostos, sendo considerada como grupo funcional e estruturalmente mais diverso de metabólitos secundários de plantas. Ocorrem predominantemente em vegetais, entretanto podem ser encontrados em alguns fungos e animais marinhos, feromônios de insetos e em suas secreções de defesa (CHENG et al., 2007).

Basicamente são misturas de hidrocarbonetos e compostos oxigenados derivados desses hidrocarbonetos, quimicamente classificados como hidrocarbonetos múltiplos de uma unidade estrutural básica, o isopreno, de fórmula geral $(C_5H_8)_n$, cuja biossíntese ocorre a partir das vias do mevalonato, no citoplasma, e do metileritritol fosfato, no cloroplasto (Figura 1) (AHRONI; JONGSMA; BOUWMEESTER, 2005; PEÑUELAS; MUNNÉ-BOSCH, 2005). Na primeira via, inicialmente ocorre a formação do mevalonato pela condensação de três unidades de acetil CoA, com posterior pirofosforilação, descarboxilação e conversão em difosfato de isopentanila (IPP), unidade básica na formação dos terpenos. A molécula de IPP e seu isômero difosfato de dimetilalila (DAMPP) formam pirofosfato de geranila (GPP), a partir do qual originam-se os demais terpenos. A associação de mais uma unidade IPP à molécula anterior forma um composto de 15 carbonos, chamado de pirofosfato de farnesila (FPP), precursor de grande parte dos sesquiterpenos. Na via do metileritritol fosfato (MEP), gliceraldeído-3-fosfato combina-se com três átomos de carbono provenientes do piruvato, formando um intermediário que posteriormente também será convertido em IPP (McGARVEY; CROTEAU, 1995; DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

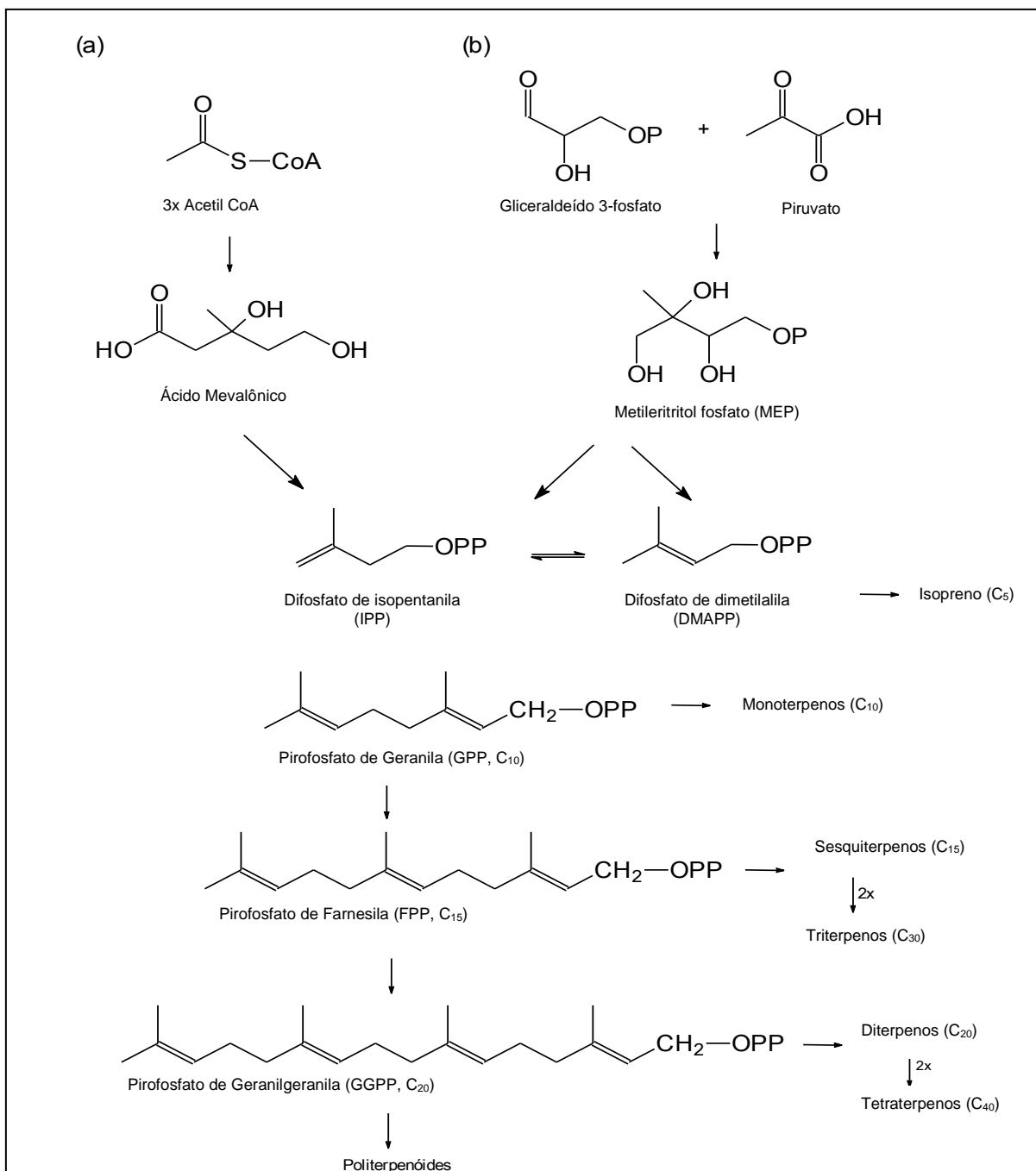


Figura 1. Rota biossintética dos terpenoides: (a) via do mevalonato e (b) via do metileritritol fosfato (Adaptado de MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

Através da união de unidades de isopreno por ação eletrofílica, formam-se grupos de terpenos, classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas ou carbonos. A união de duas unidades de isopreno constitui os monoterpenos (C₁₀H₁₆), enquanto que três unidades isoprênicas originam sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), quatro unidades formam um diterpeno (C₂₀H₃₂), seis isoprenos resultam em triterpenos (C₃₀H₄₈) e os tetraterpenos (C₄₀H₆₀) são formados por oito unidades isoprênicas, como representado na Figura 1 (BOHLMANN et al., 2000). Os

monoterpenos e sesquiterpenos ocorrem com maior frequência em óleos voláteis, sendo que o primeiro apresenta-se em cerca de 90% dos casos. Devido ao peso molecular, relacionado à baixa volatilidade, terpenos constituídos de mais de 15 carbonos, raramente ocorrem nos óleos, exceto alguns diterpenos que podem ser visualizados a partir de extração com solventes orgânicos (PEÑUELAS; MUNNÉ-BOSCH, 2005).

2.1.1.1 Monoterpenos

Os monoterpenos (C_{10}) são formados por duas unidades isoprênicas e considerados como os terpenos mais encontrados na constituição química dos óleos voláteis, abrangendo cerca de 1000 metabólitos lipofílicos e estruturalmente variados. Amplamente distribuídos em plantas superiores e algumas algas, esses compostos ocorrem em fungos e, exceto em alguns insetos, não são observados no reino animal (CROTEAU, 1987; MAHMOUD; CROTEAU, 2002)

Nos vegetais, a classe monoterpênica ocorre em pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e em canais oleíferos, armazenando-se em cascas, folhas, frutos ou flores de acordo com a especificidade do vegetal (SANGWAN et al., 2001). Estes compostos atuam principalmente na defesa, atração de polinizadores e são considerados como principais responsáveis pelo aroma devido à intensa volatilidade. Essa característica os torna amplamente empregados como inseticidas, aromatizantes e nas indústrias alimentícia e cosmética. Compostos isolados, como timol, linalol e cineol, apresentam ainda, importantes atividades biológicas (MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

Com relação à biossíntese, originam-se a partir do pirofosfato de geranila (GPP) proveniente da ligação cabeça-cauda de unidades de IPP e DMAPP pela ação da enzima preniltransferase. Frequentemente a molécula de GPP sofre ciclização, originando esqueletos de várias subfamílias (Figura 2) que compreendem monoterpenos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos. Em cada grupo, são ainda categorizados como álcoois acíclicos (geraniol, linalol, citronelol), monocíclicos (mentol, α -terpineol) e bicíclicos (fenchol e borneol); aldeídos (neral, geranial, citronelal); cetonas acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, carvona) e bicíclicas

(cânfora, tujona); ésteres acíclicos (acetato de citronelila), monocíclicos (acetato de α -terpinila) e bicíclicos (acetato de isobornila); éteres (1,8-cineol ou eucaliptol) e fenóis (timol e carvacrol) (CROTEAU, 1987; MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

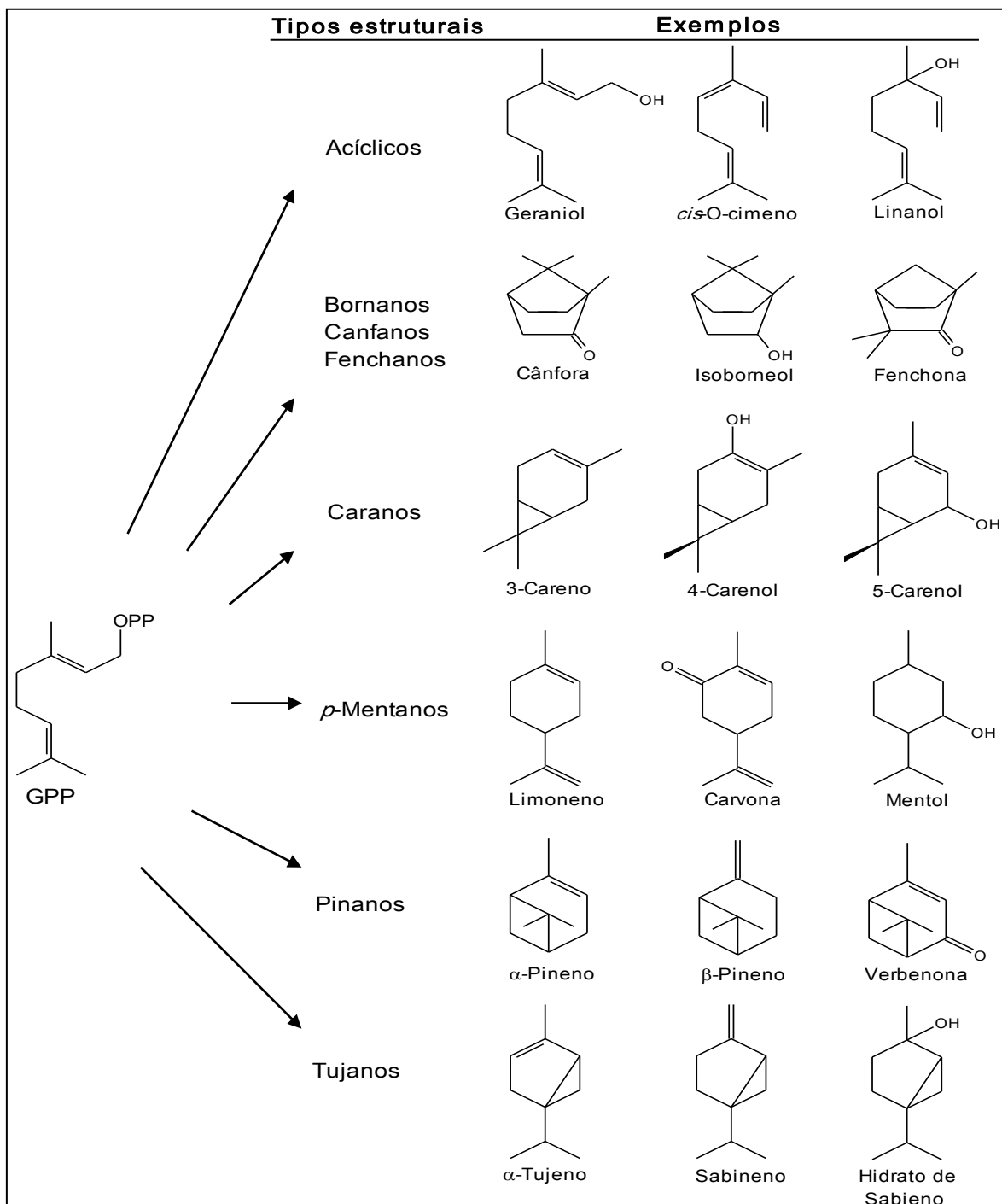


Figura 2. Representação de algumas subfamílias de monoterpenos (Adaptado de MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

2.1.1.2 Sesquiterpenos

Sesquiterpenos (C_{15}) provêm da associação de três unidades de isopreno e apresentam propriedades similares aos monoterpenos. Ocorrem, em geral, em óleos voláteis, com ampla distribuição na natureza. Muitos sesquiterpenos são produzidos como mecanismo próprio de defesa dos vegetais, a partir de propriedades antimicrobianas e inseticidas, contribuindo para a defesa global do organismo produtor (CHENG et al., 2007).

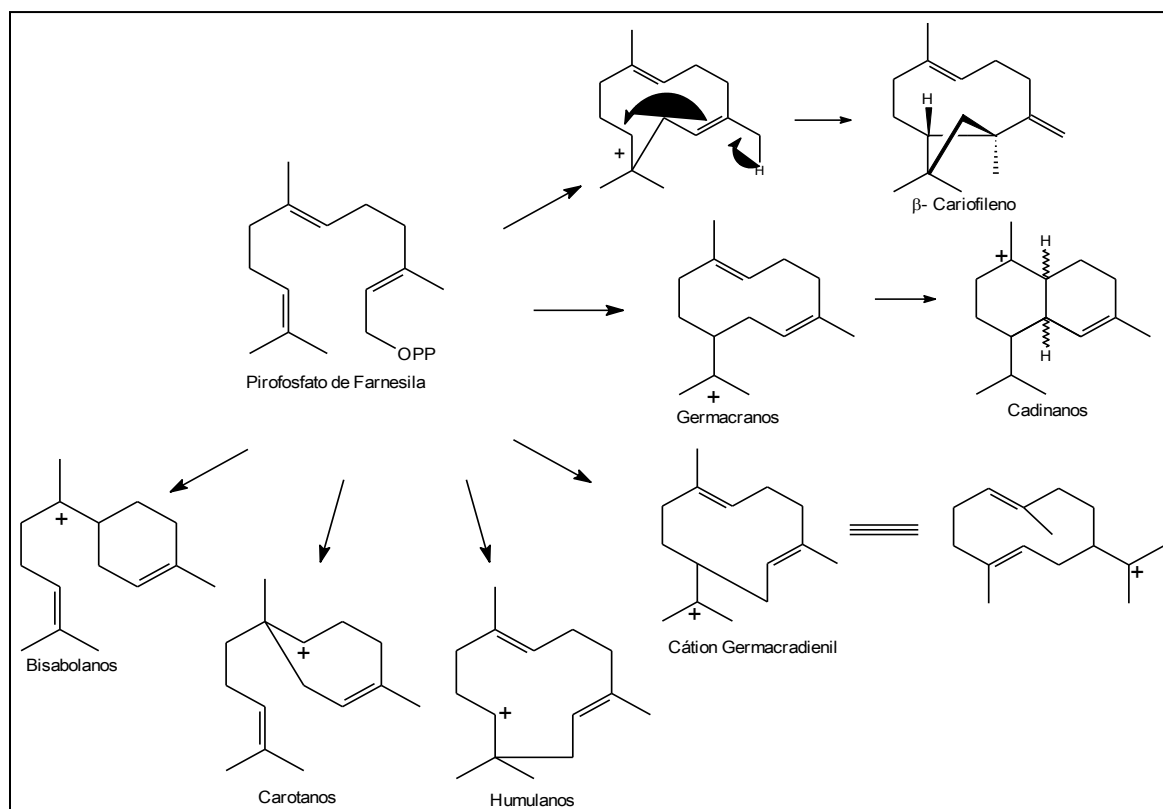


Figura 3. Estruturas representativas dos principais subgrupos de sesquiterpenos a partir do pirofosfato de farnesila (FPP) (adaptado de CHAPEEL, 1995).

A formação inicia com pirofosfato de farnesila (FPP) oriundo da reação entre GPP e uma molécula de IPP. A ciclização de FPP ou de seu isômero origina os grupos de hidrocarbonetos sesquiterpênicos mais disseminados: humulanos e cariofilanos. A mesma via pode desencadear na formação de um cátion precursor de múltiplos compostos com esqueletos bicíclicos encontrados em óleos essenciais, como germacreno D, e lactonas sesquiterpênicas. Um ataque eletrofílico na ligação dupla central de FPP induz a formação de compostos que compreendem um anel de

seis membros, como bisabolanos e derivados, ou com menor frequência, de um anel de sete membros, como os carotanos (Figura 3) (BÜLOW; KÖNIG, 2000; FELICETTI; CANE, 2004).

Assim como os monoterpenos, apresentam grupos químicos estruturalmente variados, incluindo hidrocarbonetos (β -bisaboleno e β -cariofileno), álcoois (carotol e farnesol), aldeídos (β -sinensal), ésteres (cedrila), cetonas (β -vetivona), entre outros (STEELE et al., 1998; FELICETTI; CANE, 2004; THOLL et al., 2005; NAVARRO-MOLL et al., 2011).

2.1.2 Propriedades biológicas

Diversas pesquisas têm demonstrado que os óleos voláteis e seus constituintes possuem uma vasta gama de atividades biológicas com importantes aplicações nas indústrias química, alimentícia, cosmética e farmacêutica (KAMATOU et al., 2007; LIOLIOS et al., 2009; KÖSE et al., 2010). Ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e repelente estão entre as atividades mais relatadas, entretanto, pesquisas apontam potenciais efeitos antiulcerosos, ansiolíticos, inseticidas, antivirais, antiparasitários, antinociceptivos, anticâncer, entre outros (ĐORĐEVIĆ et al. 2007; BAKKALI et al., 2008; LOPES-LUTZ et al., 2008; CHEN et al., 2009; RADULOVIĆ et al., 2012). Efeitos sobre fitopatógenos são também amplamente investigados e estudos relataram atividades inseticida e antifúngica promissoras (ANGIONI et al., 2003; ABDELGALEIL et al., 2008).

Muitos desses efeitos estão relacionados aos constituintes isolados e apesar da complexa composição química, alguns óleos são caracterizados pela presença de um composto majoritário. Neste caso, a relação direta com a atividade biológica é facilitada. Timol, cineol, mentol, cânfora, linalol e limoneno são alguns dos compostos descritos apresentando atividade antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, e anticâncer, além de efeitos sobre o sistema nervoso central (BAKKALI et al., 2008; LOPES-LUTZ et al., 2008). No entanto, compostos minoritários exibem também efeitos biológicos ou favorecem a ação, caracterizando sinergismo. A ocorrência desse evento entre os componentes do óleo volátil contribui significativamente para o efeito biológico. Em muitos casos, o óleo total é

considerado mais potente quando comparado aos seus constituintes isolados (ROMAGNOLI et al., 2005; PAVELA et al. 2010; KURDELAS et al., 2012; CABRAL et al., 2013).

2.2 Considerações sobre a Família Asteraceae

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.500 gêneros e 25.000 espécies, agrupadas em três subfamílias, e 17 tribos, amplamente distribuídas, principalmente em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (BERETTA et al., 2008). São plantas de aspecto extremamente variado, predominantemente herbáceas, incluindo, pequenas ervas ou arbustos, com poucos gêneros lenhosos (CANCELLI et al., 2010).

Muitos exemplares têm importância econômica, aromática, medicinal, comestível, ornamental e inseticida, e por esse motivo são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica. Os óleos voláteis, por exemplo, estão amplamente distribuídos nesta família, e assim como as lactonas sesquiterpênicas, responsáveis pelos importantes efeitos farmacológicos (BERETTA et al., 2008).

2.2.1 Considerações sobre o gênero *Stenachaenium* Benth.

O gênero *Stenachaenium* Benth. foi descrito por Benth em 1873 e subsequentemente incluído na tribo Inuleae (BARROSO, 1986). Compreende cinco espécies: *Stenachaenium adenanthum* Krasch. *Stenachaenium campestre* Baker, *Stenachaenium macrocephalum* Benth. ex Benth. & Hook.f., *Stenachaenium megapotamicum* Baker e *Stenachaenium riedelli* Baker. No Brasil, este gênero está distribuído nos três estados do sul e no sudeste de São Paulo, em domínios fitogeográficos de Mata Atlântica e Pampa. Pode ocorrer também no Uruguai e nordeste da Argentina (LOEUILLE, 2010).

Beretta e colaboradores (2008) classificaram botanicamente o gênero *Stenachaenium* de acordo com as seguintes características: cipsela (pseudofruto proveniente de um pistilo dicarpelar, unilocular e uniovulado, frequentemente coroado por um papilho de escamas, cerdas, aristas ou pêlos - Figura 4) glabra, comprimida dorsiventralmente, com uma costela central em cada lado, onde *S. megapotamicum* apresenta folhas inferiores com disposição helicoidal; cipsela madura de coloração castanho escura, *S. campestre*, cipsela pilosa, não comprimida dorsiventralmente, multicotada, e as espécies *S. macrocephalum* e *S. riedelli*, exibem folhas inferiores com disposição não helicoidal; cipsela madura de coloração castanho clara, sendo diferenciadas pelas folhas da região mediana do caule reduzidas em relação às folhas basais e tomentosas, para a primeira, e folhas da região mediana do caule não reduzidas em relação às folhas basais e seríceas, para a segunda.

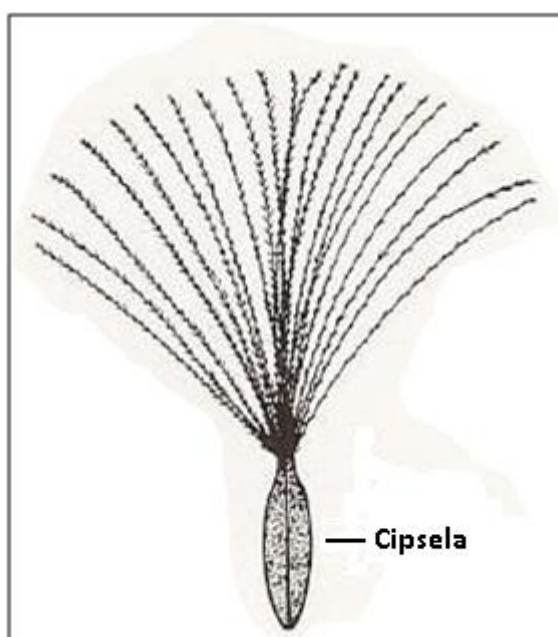


Figura 4. Representação esquemática de cipsela da espécie *Stenachaenium megapotamicum* com aproximadamente 3 mm de comprimento (MARODIN; RITTER, 1997).

Apesar de não abordada no estudo em virtude da impossibilidade de coleta, *Stenachaenium campestre* Baker, é a única espécie em que há relatos quanto ao nome e uso popular, sendo conhecida como arnica-do-campo e arnica-silvestre (GALVANI; BARRENECHE, 1994; ALICE et al., 1995). Refere-se a uma herbácea com caule alado, simples ou bifurcado e poucos capítulos, descrita habitando campos com afloramento rochoso, secos com gramíneas baixas e campos com

vassoural, florescendo e frutificando no verão (SIMÕES et al., 1990; MARODIN; RITTER, 1997; BAKER, 1878 apud BERETTA et al., 2008).

A espécie *S. adenanthum* Krasch. (sin. *Dichropappus adenanthus* Sch.Bip. ex Krasch) é descrita como uma erva perene, ocorrente em campos com afloramentos rochosos, campos secos com gramíneas baixas e campos com vassoural (CANCELLI et al., 2010).

Stenachaenium macrocephalum Benth. ex Benth. & Hook. f. é descrita como uma erva perene, de pequeno porte, com altura de 0,2-0,4 metros, com caule alado e densamente piloso, florescendo e frutificando na primavera. Ocorre também em campos secos com gramíneas e afloramentos rochosos (MARODIN; RITTER, 1997; Goett. Abh. Xxiv (1879) 183 apud BERETTA et al., 2008).

Stenachaenium megapotamicum Baker é caracterizada como uma herbácea de até 1,75 m de altura, com caule alado e folhas inferiores e caulinares com disposição helicoidal. Também floresce e frutifica na primavera, apresentando um forte odor. Sua ocorrência é descrita para campos com afloramentos rochosos, secos com gramíneas baixas e campos com vassoural. (MARODIN; RITTER, 1997; Fr. Brás. 6(3): 105 apud BERETTA et al., 2008).

A espécie *S. riedelli* Baker habita em campos com afloramento rochoso, campos secos com gramíneas baixas e campos secos com vassoural. É uma herbácea com até 1,2 m de altura, com alas onduladas, onde somente as folhas caulinares são helicoidais. Floresce e frutifica no verão e outono e caracteriza-se por forte odor fétido (MARODIN; RITTER, 1997; BAKER, 1878 apud BERETTA et al., 2008).

Esse gênero, apesar de pertencer a uma família botânica conhecida pelos importantes efeitos biológicos, apresenta escassos relatos de estudos na literatura especializada em relação à fitoquímica e atividade farmacológica, sendo apenas referenciado em levantamentos florísticos da região, como um grupo de ocorrência ampla no sul do Brasil (RITTER; BAPTISTA, 2005; BARROS et al., 2007; FERREIRA et al., 2010). Apenas a espécie *S. campestre* é citada nesses estudos

com usos populares como cicatrizante, anti-inflamatório, antitrombótico, anticoagulante, antireumático, abortivo e em acidentes com animais peçonhentos (BARROS et al., 2007).

2.2.2 Atividades biológicas de óleos voláteis de espécies da Família Asteraceae

Como já relatado, óleos voláteis de diversas espécies pertencentes a esta família foram descritos demonstrando variados efeitos biológicos. Estudos relacionam a estes compostos desde atividades como inseticida, antibacteriana, antioxidante, antiulcerosa, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, antimalárica, antifúngica à efeito contra fitopatógenos, aflatoxinas e micotoxinas (ORTEGA et al., 2005; BASILE et al., 2006; ĐORĐEVIĆ et al., 2007; HULLEY et al., 2010a; HULLEY et al., 2010b; PAVELA et al., 2010; AKROUT et al., 2011; ONG et al., 2011).

O óleo volátil de *Pteronia incana* Burm., por exemplo, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas responsáveis por infecções respiratórias (HULLEY et al., 2010b). Os mesmos pesquisadores evidenciaram que a espécie *P. onobromoides* exibiu semelhante efeito contra *Staphylococcus epidermidis* (HULLEY et al., 2010a). O óleo de *Artemisia campestris* L. demonstrou atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiviral, através da presença de diferentes quimiotipos. Nesse estudo, Akrouit e colaboradores (2011), observaram a inibição do crescimento de células de adenocarcinoma humano e atribuiu-se este efeito ao α -pineno, β -pineno e limoneno, importantes componentes do óleo volátil. O óleo de *Achillea millefolium* Afan. apresentou potente atividade antioxidante e gastroprotetora (CANDAN et al., 2003; POTRICH et al., 2010), enquanto que o óleo das raízes de *Bidens tripartita* L. exibiu pronunciada atividade fungistática contra espécies do gênero *Candida* (TOMCZYKOWA et al., 2011).

2.3 Atividades Biológicas

Substâncias isoladas de vegetais com propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante são investigadas como alternativas a fármacos sintéticos

convencionais. Especificamente, compostos que possuem tais propriedades são potenciais atuantes em processos infecciosos (CHEN et al., 2009; JIA et al., 2010; TUMEN et al., 2011). Tanto uma infecção bacteriana quanto fúngica ou viral provoca ativação do sistema imune, através de células de defesa (macrófagos, monócitos e neutrófilos) que reagem a respostas de absorção fagocitária e produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e o fator de necrose tumoral (TNF) (YU et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Além das infecções, as inflamações também levam à síntese de enzimas pró-inflamatórias responsáveis pelo aumento do NO e das PGs (WU; TEIK, 2007; COY; CUCA; SEFKOW, 2009). A atividade anti-inflamatória associada à ação antifúngica de uma substância tem a vantagem de reduzir sintomas, como prurido, ardor e eritema, normalmente relacionados a infecções fúngicas tópicas, e ainda, auxiliar no restabelecimento das condições da flora normal da pele (HAVLICKOVA; FRIEDRICH, 2008). Dessa forma, os óleos voláteis que possuem propriedades antimicrobianas associadas a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes são considerados como alternativa na substituição ou complementação da terapia com antibióticos sintéticos (KÖSE et al., 2010).

2.3.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos voláteis é descrita por vários autores, e geralmente está associada a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes atuando principalmente em infecções cutâneas e de mucosas, e no trato respiratório (CANDAN et al., 2003; BOUNATIROU et al., 2007; ĐORĐEVIĆ et al., 2007; LOPES-LUTZ et al., 2008; SINGH et al., 2008; BAJPAI et al., 2009; AHMADI et al., 2010; ZENG et al., 2011a).

Apesar de inúmeros estudos confirmando essa atividade, o mecanismo de ação ainda é amplamente investigado, sugerindo-se que ocorra, em grande parte, à sua característica hidrofóbica, que melhora a penetração na membrana celular do microrganismo, auxiliando na ação antimicrobiana dos seus componentes (OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010). No estudo de Tolouee e colaboradores (2010), o óleo volátil obtido das flores de *Matricaria chamomilla* L., apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* através da inibição do crescimento de hifas.

Nesse caso, os autores sugerem que esse efeito se deve à capacidade de alteração da permeabilidade celular fúngica, rompendo a membrana citoplasmática e as organelas intracelulares das mesmas, acarretando na lise celular. Há também especulações de que os óleos possam atuar acumulando-se na bicamada lipídica da membrana, levando a sua ruptura e perda de funções (LIOLIOS et al., 2009; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010).

A complexa mistura de constituintes de um óleo volátil, associada ao efeito sinérgico que ocorre entre os mesmos, dificulta a identificação do composto responsável pela ação. Alguns autores, entretanto, relacionam essa atividade a determinados constituintes, de acordo com suas características químicas. A importante atividade antifúngica associada à atividade antioxidante, demonstrada pelo óleo obtido de *Bidens pilosa* Linn. é justificada pelos autores como ação dos monoterpenos, β -cariofileno e óxido de cariofileno, contra radicais livres (DEBA et al., 2008). Da mesma forma, Zeng e colaboradores (2011b), atribuem ao eugenol, um dos principais componentes fenólicos do óleo volátil de *Gnaphlium affine*, a potente atividade antimicrobiana observada.

2.3.1.1 Atividade antidermatofítica

Dermatofitoses são processos infecciosos causados por um grupo de fungos capazes de invadir e infectar tecidos queratinizados, pelo, pele e unhas, tanto em humanos quanto em animais. Comuns em países em desenvolvimento, em geral essas infecções são superficiais, mas podem afetar mucosas (NAHAR et al., 2010; BALAKUMAR et al., 2011). A denominação dessas patologias é definida conforme a região anatômica afetada, como *tinea barbae*, afetando barba e bigode e *tinea capitis*, infectando o couro cabeludo (DIEGO, 2011).

Os dermatófitos, fungos causadores desta patologia, classificam-se em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Em relação ao gênero *Epidermophyton* a espécie *E. floccosum* é a única patogênica ao homem, enquanto que o gênero *Microsporum* apresenta aproximadamente 20 espécies, sendo 10 deles patógenos humanos. *Trichophyton* é considerado o gênero mais frequente implicado em quadros de infecção humana, onde as espécies *T. rubrum* e *T.*

mentagrophytes complex (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*) são comumente responsáveis por grande parte dos casos de *tinea* (DIEGO, 2011).

Infecções causadas por dermatófitos são de difícil manejo. Cura espontânea é muito improvável, exigindo, portanto, tratamento na maioria dos casos (DIEGO, 2011). A terapia além de complexa tem alto custo, é longa e frequentemente apresenta recorrência (JAMALIAN et al., 2012). Além desses fatores, o aumento da resistência às drogas pelos patógenos e o crescente número de pacientes imunocomprometidos, caracterizados como alto risco, constitui este tipo de infecção fúngica como um problema mundial (PINTO et al., 2006; BALAKUMAR et al., 2011). Nesse sentido, esforços científicos têm sido realizados com a finalidade de desenvolver tratamentos que possam ser empregados como alternativa à terapia convencional, com grande interesse na investigação da ação antifúngica de diferentes extratos vegetais e óleos voláteis (BAJPAI et al., 2009).

2.3.2 Atividade anti-quimiotática

Durante um processo infeccioso ou inflamatório milhares de leucócitos polimorfonucleares migram da circulação sanguínea ou local de armazenamento para o foco da injúria. Esse processo migratório é designado como quimiotaxia. Mediadores inflamatórios como citocinas e produtos bacterianos atuam na regulação desse processo, agindo como agentes quimiotáticos (GRUTKOSKI et al., 2003). A ativação desse processo pode ser um importante mecanismo pelo qual as células do sistema imune se localizam nos locais de inflamação. Estudos a partir de substâncias de origem vegetal têm investigado a capacidade de inibição da migração leucocitária como um mecanismo relacionado a propriedades anti-inflamatórias do composto (MONKS et al., 2002; ANDRADE et al., 2011; SUYENAGA et al., 2011; BARROS et al., 2013). Uma substância com propriedades anti-inflamatórias auxilia de forma fundamental no tratamento em determinados estágios de um processo infeccioso considerando que são responsáveis pela resposta imune inata (ROMANI, 2011).

O ensaio da câmara de Boyden, empregado para determinação da antiquimiotaxia, foi desenvolvido por Stephen Boyden em 1962 e posteriormente adaptado por Zigmond e Hirsch (1973). Essa técnica permite avaliar a resposta quimiotática ou antiquimiotática de uma substância. No primeiro caso observa-se, experimentalmente, um número aumentado de células migrando através de um filtro quando a substância é aplicada no compartimento inferior da câmara, ao contrário do segundo, que o composto avaliado é adicionado ao compartimento superior e impede o processo migratório (ENTSCHLADEN et al., 2005).

2.3.3 Atividade antioxidante

Além da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, compostos naturais podem exercer efeito antioxidante através da inibição de moléculas reativas (TEPE et al., 2007). A oxidação é um processo biológico para produção de energia, intrínseco e controlado por vários mecanismos celulares (HOSSAIN; SHAH, 2011; ZENG et al., 2011b). O estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a produção de oxidantes, está envolvido em diversas situações patológicas, inclusive infecções fúngicas, doenças cardiovasculares, processos inflamatórios e doenças neurológicas, como a Doença de Parkinson e de Alzheimer, além de acelerar o envelhecimento (MASTELIC et al., 2008; JIA et al., 2010; SAEI-DEHKONDI et al., 2010).

Antioxidantes atuam inibindo ou retardando o processo de oxidação através da complexação de íons metálicos, decomposição de peróxidos e agentes redutores de radicais livres, reduzindo, conseqüentemente, o dano tecidual causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (MIGUEL, 2010; OZEN; DEMIRTAS; AKSIT, 2011; VIUDA-MARTOS et al., 2011; ZENG et al., 2011a). Devido à sua propriedade redox, substâncias antioxidantes, atuam como doadores de hidrogênio e agentes redutores, modulando o processo de cicatrização (TEPE et al., 2005; BAJPAI et al., 2009; CHEN et al., 2009; YU et al., 2011).

Fenilpropanoides, como eugenol e carvacrol, e hidrocarbonetos monocíclicos, pertencem aos ativos naturais responsáveis pela atividade antioxidante mais relatada para óleos voláteis (MASTELIC et al., 2008; VIUDA-

MARTOS et al., 2011). Entretanto, estudos mostraram que monoterpenos, como timol e γ -terpineno apresentaram ação antioxidante marcante, podendo atuar na inibição da peroxidação lipídica (TEPE et al., 2007; OZEN; DEMIRTAS; AKSIT, 2011).

2.3.3.1 Reação com 2-2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade sequestradora de radicais livres pelos óleos voláteis é indicada, comumente, pelo método de redução da absorção de 2-2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este ensaio baseia-se na capacidade do radical livre estável, DPPH, reagir com substâncias doadoras de H^+ tornando-se capaz de interromper um processo oxidativo. Inicialmente, os radicais DPPH exibem coloração roxa, devido aos elétrons livres. O contato com substâncias antioxidantes capazes de estabilizá-los, atuando como doadores de um radical hidrogênio, resulta na perda desta coloração e diminuição da absorção (SANTOS et al., 2007). No caso de óleos voláteis, essa capacidade pode ser atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos devido à propriedade de doação de hidrogênios (TENORE et al., 2011).

2.3.3.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) avalia a capacidade de inibição da peroxidação lipídica de uma substância. A susceptibilidade à oxidação e abundância dos lipídios nas estruturas celulares torna-os frequentes alvos de agentes oxidantes, originando produtos altamente reativos. O ensaio avalia a formação de produtos finais da peroxidação. Um dos principais produtos formados nesse processo oxidativo é o malondialdeído, que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH ácido e alta temperatura, formando um complexo de cor rósea com absorção entre 532-535 nm (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Além do malondialdeído, outros compostos secundários originários da peroxidação lipídica também podem reagir com TBA e possibilitar a quantificação por espectrofotometria (BOUNATIROU et al., 2007).

2.4 Sistemas nanoparticulados

Pesquisas em nanotecnologia são aplicadas a várias áreas, como eletrônica, cosmética, farmacêutica, ciência forense e indústrias de corantes e enzimas (CHEN et al., 2007; YANG et al., 2009; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). No contexto farmacêutico, a principal vantagem dessa tecnologia está na capacidade de carregamento de substâncias devido ao tamanho nanométrico das partículas (LERTSUTTHIWONG et al., 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Problemas em formulações farmacêuticas são, muitas vezes, causados pela fraca solubilidade em água e instabilidade dos compostos oleosos, o que pode resultar na degradação de seus componentes e formação de produtos alergênicos (SANSUKCHAREARNPON et al., 2010). Contudo, a utilização desses sistemas pode ser considerada como uma alternativa de transporte para substâncias com tal característica, pela capacidade de incorporar compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos associados à vantagem de possibilitar a liberação controlada do fármaco (LERTSUTTHIWONG et al., 2008; GAJBHIYE et al., 2009; PANCHAMUKHI et al., 2011). Proteção da substância contra ações do meio ambiente, melhora da penetração intracelular em tecidos biológicos e na retenção cutânea, prolongamento do efeito da substância, diminuição da irritabilidade tecidual devido à liberação lenta do fármaco, melhora na especificidade, tolerabilidade e solubilidade do composto, além da aplicabilidade em outros produtos, são benefícios descritos para sistemas nanoparticulados. No caso dos óleos voláteis pode trazer ainda a vantagem de diminuição da volatilização, com conseqüente redução na perda de material (PANDEY et al., 2005; LERTSUTTHIWONG et al., 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SANSUKCHAREARNPON et al., 2010).

2.4.1 Nanoemulsões

Nanoemulsões estão entre as formas mais comuns de utilização da nanotecnologia na aplicação farmacêutica (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Um sistema nanoemulsionado compõe-se de finas dispersões coloidais de pelo menos dois líquidos imiscíveis, com tamanho de partículas até 1 μm (BOUCHEMAL et al., 2004). Em geral apresenta-se como emulsões óleo-água, mas

podem ocorrer como água-óleo dependendo qual componente constitui a fase dispersa (FORGIARINI et al., 2001).

O reduzido tamanho das partículas nesse sistema fornece maior estabilidade à floculação e coalescência, em comparação com emulsões convencionais (ZIANI et al., 2011). Geralmente apresentam-se como leitosas e cineticamente estáveis. O pequeno tamanho de partícula, associado à baixa tensão superficial, fluidez e ampla área de superfície do sistema, auxilia na deposição uniforme e liberação dos ingredientes ativos na pele, por isso é amplamente empregado para aplicação cutânea (BOUCHEMAL et al., 2004). Além disso, possibilita a incorporação de múltiplos compostos ativos em um único sistema carreador, aumentando sua eficácia (ZIANI et al., 2011).

2.4.2 Sistemas nanoparticulados contendo óleo volátil

Pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de obter sistemas nanoparticulados capazes de carrear óleos voláteis, cuja principal finalidade consiste na estabilização da volatilização e potencialização de atividades biológicas. Como anteriormente citado, esse grupo químico tem sido pesquisado por apresentar importantes e promissoras atividades biológicas, além da possibilidade de incorporação em preparações farmacêuticas para o tratamento cutâneo (FLORES et al., 2011).

A insolubilidade em água é outro fator que leva à busca de sistemas capazes de incorporar tais substâncias, assim como a redução da toxicidade, caracterizada por irritação cutânea capaz de desencadear processos alérgicos. Grande parte desses compostos é instável devido a suas funcionalidades, e sua degradação não causa somente alteração nas características sensoriais, mas gera produtos alergênicos. A ocorrência de reações alérgicas é descrita devido à oxidação dos compostos presentes no óleo que ocorrem de acordo com as condições de estocagem (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; SANSUKCHAREARNPON et al., 2010).

Outro importante benefício de nanosistemas carreadores de óleos voláteis consiste na potencialização das atividades biológicas relacionadas a esses compostos. Na indústria alimentícia, por exemplo, onde as propriedades antimicrobianas dos óleos e de seus constituintes isolados são amplamente exploradas, o desenvolvimento de um nanosistema contribui ainda para o mascaramento do odor do óleo. A aplicação de diferentes sistemas nanométricos com a finalidade de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de óleos voláteis, bem como potencializar sua atividade biológica também foram descritos (ZHAO et al., 2010; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013). Nanopartículas de quitosana contendo eugenol e carvacrol, conhecidos constituintes desse grupo de metabólitos, melhoraram a ação antioxidante e antibacteriana do sistema, comparados ao efeito das nanopartículas de quitosana isoladamente. Segundo os autores, o encapsulamento de agentes antimicrobianos tem a vantagem de auxiliar no mecanismo de absorção celular, em virtude do tamanho nanométrico das partículas, diminuindo a possibilidade de resistência, além de proteger o óleo contra a degradação ou evaporação (DONSÌ et al., 2011).

2.4.3 Método de emulsificação espontânea

Fundamentalmente, essa técnica consiste na adição da fase orgânica à fase aquosa ainda sob agitação constante e fluxo contínuo, onde a fase orgânica compõe-se de um óleo solubilizado em solvente orgânico miscível em água, enquanto que a fase aquosa contém, além da água, um tensoativo hidrofílico. A formação da nanoemulsão ocorre através da difusão do solvente orgânico na fase externa da solução aquosa. A fase final desse processo consiste na evaporação do solvente orgânico através de um sistema de pressão reduzida (BOUCHEMAL et al., 2004; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Essa técnica assume importantes vantagens sobre outros métodos físicos, como facilidade de desenvolvimento em escala laboratorial, emprego de temperaturas baixas, exigência de equipamentos pouco sofisticados e utilização de concentrações reduzidas de surfactantes e espessantes. Outra grande vantagem desta técnica é a quantidade de variáveis que podem ser controladas para a obtenção da nanoemulsão ideal, tais como a velocidade do fluxo na adição da fase

orgânica, o tempo de contato entre as fases e o controle de pressão e temperatura. Entretanto, possui a desvantagem do emprego de solventes orgânicos e aplicação a nível industrial dificultada (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010).

3.1 Material vegetal

Folhas e flores de *S. adenanthum*, *S. macrocephalum*, *S. megapotamicum* e *S. riedelli* foram coletadas de populações nativas nos municípios de Nova Santa Rita e Canela, no Rio Grande do Sul. O material vegetal foi identificado pelo botânico Dr. Sérgio L. Bordignon, professor do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração, Centro Universitário La Salle, e uma exsicata de cada espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

3.2 Obtenção do óleo volátil

O óleo volátil foi obtido a partir das folhas e flores frescas, reduzidas com auxílio de um triturador mecânico e submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo-Clevenger, durante 4 horas, de acordo com o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). A determinação do rendimento foi realizada pela leitura do volume de óleo coletado. As amostras obtidas foram estocadas em frasco de vidro sob refrigeração 4-5 °C até o momento da análise a fim de prevenir alterações na composição química.

3.3 Análise química do óleo volátil

Para análise cromatográfica os óleos obtidos por hidrodestilação foram diluídos a 2% em éter etílico (v/v) (Tédia®). As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas em cromatógrafo à gás acoplado a um detector de massas (CG/MS), modelo Shimadzu QP5000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Durabond-DB-5 (John Wiley & Sons Scientific, US, com 30 m x 0,25 mm e preenchida com um filme de 0,25 µm de espessura de polidimetildifenilsiloxano contendo 5% de grupamentos fenila) para separação dos constituintes. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas a 200 °C e 250 °C, respectivamente e a temperatura da coluna foi programada com rampa de aquecimento de 60 °C a 300 °C com variação de 3 °C/min, com hélio como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 ml/min.

Os componentes foram identificados por comparação de seu índice de retenção, calculado por interpolação linear relativa para o tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos, e seu espectro de massa, com dados obtidos na literatura (ADAMS, 2009), bem como, por comparação com espectros de massa de espectroteca de aquisição (NIST 62 e 12 - National Institute of Standards and Technology, Kyoto, JP). Para o cálculo do índice de retenção relativo (I) foi utilizada a seguinte equação:

$$I = 100z + 100 \frac{(t'_{RX} - t'_{RZ})}{(t'_{R(Z+1)} - t'_{RZ})}$$

Onde,

z = número de carbonos do composto com menor peso molecular;

*t'*_{RX} = tempo de retenção do composto *x*, sendo *t'*_{RX} intermediário entre *t'*_{RZ} e *t'*_{R(Z+1)};

*t'*_{RZ} e *t'*_{R(Z+1)} = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

Quantidades relativas de cada composto foram calculadas a partir das áreas dos picos do CG.

3.4 Desenvolvimento da nanoemulsão contendo óleo volátil de *Stenachaenium megapotamicum*

Foram desenvolvidas formulações através do método de emulsificação espontânea adaptado de Flores et al., (2011), a partir de uma fase orgânica constituída de óleo volátil de *S. megapotamicum* (0,332 mg/mL), dissolvido em 27 mL de etanol (Tedia®), e de uma fase aquosa contendo 53 mL de água ultrapura (Milli-Q® Milipore®) e 0,07 mL de polissorbato 80 (Vetec®), como tensoativo, denominadas Nanoemulsão A e Nanoemulsão B. A Nanoemulsão B, diferiu-se pela adição de 160 µL de triglicerídios de cadeia media do ácido cáprico/caprílico (TCM) (Brasquim®) e evaporação total do solvente orgânico, enquanto que na Nanoemulsão A, manteve-se o solvente no sistema.

Basicamente, o procedimento consistiu na dissolução completa dos componentes em cada fase separadamente, sob agitação moderada em agitador

magnético (Velp Scientifica, Usmate, IT) e banho-maria à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos. Para formação da nanoemulsão, a fase orgânica foi vertida, lentamente e de forma constante, sobre a fase aquosa, e mantida sob agitação magnética moderada e banho-maria à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante o mesmo período. A Nanoemulsão B foi submetida à evaporação do solvente orgânico a partir de equipamento de rota evaporador (Büchi, modelo V-855, Flawil, CH) e em banho-maria à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob moderada agitação magnética. Como controle foram desenvolvidas formulações semelhantes as formulações A e B, sob as mesmas condições, excluindo-se apenas o óleo volátil de sua composição, substituindo-o por quantidades iguais de TCM. As formulações obtidas foram mantidas sob refrigeração ($4\text{-}5\text{ }^{\circ}\text{C}$), em frasco âmbar, para posterior análise.

3.5 Caracterização da nanoemulsão

3.5.1 Aspectos macroscópicos

A formulação foi caracterizada em termos macroscópicos, considerando-se aspecto visual, presença de separação de fases ou precipitado.

3.5.2 Determinação do pH

A determinação do pH da nanoemulsão foi realizada diretamente na amostra através da utilização de um pHmetro (Digimed, modelo DM-20, Santo Amaro, BR) calibrado com tampões de pH 4 e 7, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em média \pm EPM de três determinações.

3.5.3 Determinação do tamanho da partícula e índice de polidispersão

O diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão foram mensurados através da espectroscopia de correlação de fótons em equipamento Zetasizer Nanoseries Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Essa determinação foi realizada após diluição da amostra na razão de 1:500 (v/v) em água

ultrapurificada (Milli-Q® Milipore®) e filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®). Os resultados foram expressos em média ± EPM de três determinações.

3.5.4 Determinação do teor de óleo volátil na nanoemulsão

Para a determinação do teor de óleo volátil contido na nanoemulsão, estabeleceu-se uma curva para o óleo puro (concentrações de 0,01 a 0,2 mg/mL) em equipamento de espectrofotometria (Agilent Technologies, modelo 8453, Santa Clara, US) no comprimento de onda de 245 nm, a partir de uma varredura de 200 – 600 nm. Para cada mensuração a formulação foi solubilizada em metanol grau HPLC (0,1 mg/mL) (Tedia®), homogeneizada em vórtex por 3 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro a 245 nm. O teor obtido foi expresso como percentual de óleo na formulação.

3.6 Atividade antifúngica

3.6.1 Microrganismos

Para a avaliação da atividade antifúngica realizou-se um *screening* contra isolados clínicos de *Candida albicans* (CA02), *C. krusei* (CK04), *C. tropicalis* (CT56), *C. parapsilosis* (CPA154), *C. glabrata* (CG01), *Epidermophyton floccosum* (EPF07 e EPFW4), *Trichophyton rubrum* (TRU31), *T. mentagrophytes* (TME12, TME33 e TME35), *Microsporium canis* (MCA29, MCA01 e MCA36), *M. gypseum* (MGY48 e MGY35) e *Scytalidium dimidiatum* (SDY08).

3.6.2 Obtenção do inóculo

A obtenção de células viáveis para o teste procedeu-se a partir de isolados crescidos em Agar Sabouraud contendo cloranfenicol 0,04% a 30 °C, por 48 horas para fungos leveduriformes e 7 dias para fungos filamentosos. O inóculo foi preparado a partir dos protocolos padronizados pelos documentos M27-A3 e M38-A2, determinados pelo Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b), por espectrofotômetro, ajustados a partir de densidade óptica para concentração final pré-estabelecida.

3.6.3 *Screening*

O *screening* foi realizado para fungos filamentosos e leveduriformes baseado no método de microdiluição em caldo, segundo os protocolos M27-A3 e M38-A2, respectivamente, padronizados pelo CLSI (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b). Nesse ensaio, as amostras foram diluídas em caldo de Sabourad-dextrose até a concentração pretendida em placas de microdiluição de 96 poços, com posterior adição do inóculo e incubação à 35 °C.

3.6.4 Determinação da concentração inibitória mínima

Em virtude dos isolados de *Candida* apresentarem resistência as amostras testadas no *screening*, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) apenas para os fungos filamentosos. Para esse ensaio, utilizou-se o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008b), em RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo l-glutamina, sem bicarbonato de sódio – tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS). Testou-se concentrações na faixa de 1,9 a 500 µg/mL e uma alíquota de 100 µL de cada concentração foi inoculada nos poços correspondentes da placa. A CIM foi definida como a menor concentração da substância na qual o microrganismo testado não demonstrava crescimento visível. Terbinafina foi usada como controle positivo. A associação da nanoemulsão controle e o meio de cultura, e ainda, a associação da nanoemulsão controle, meio de cultura e microrganismo, e também o meio de cultura isoladamente, foram utilizados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas e a determinação do CIM foi realizada pelo método visual, usando o corante resazurina.

3.6.5 Determinação da concentração fungicida mínima

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pelo sub-cultivo de 10 µL das concentrações correspondentes à concentração inibitória e duas concentrações imediatamente mais concentradas em placas de ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol. Após 72 horas de incubação a 30 °C, a determinação da CFM foi realizada baseada no crescimento dos controles, considerando como CFM

a menor concentração da substância testada que impediu o crescimento visível da subcultura.

3.7 Atividade antiquimiotóxica

A atividade antiquimiotóxica *in vitro* foi avaliada pela técnica de Boyden (1962) descrita por Suyenaga e colaboradores (2011). Neste ensaio empregou-se câmaras cilíndricas, construídas em acrílico transparente e divididas em dois compartimentos (capacidade de 0,5 mL cada). O compartimento inferior foi preenchido com uma solução contendo o fator quimiotáxico (solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* – LPS - Sigma-Aldrich®) enquanto que o compartimento superior continha uma solução de neutrófilos adicionados à amostra e separado do compartimento inferior por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 µm de diâmetro (Millipore®, Billerica, EUA).

As câmaras foram preparadas em duplicata e incubadas à 37 °C durante 1 hora em atmosfera úmida. Posteriormente, os filtros foram removidos, fixados, corados, diafanizados *overnight*, e montados entre lâmina e lamínula. A leitura dos filtros foi realizada sob microscopia óptica com microscópio Nikon, modelo Alphaphot-2 YS2 (Nikon, Shanghai, CH), utilizando-se ampliação de 40 vezes. A migração foi determinada pelo aprofundamento do foco, a partir do plano superior do filtro, até que apenas duas células fossem visíveis em foco. Assim, a distância medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro e das últimas células observadas, permitiu a avaliação da capacidade migratória dos neutrófilos, no gradiente de concentração do fator quimiotáxico, que se estabeleceu entre os dois compartimentos (ZIGMOND; HIRSCH, 1973). A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro e o resultado expresso como média ± EPM.

As concentrações testadas para as amostras de óleo volátil e da nanoemulsão estão descritas na sessão de resultados. Indometacina foi utilizada como controle positivo na concentração de 10 µg/mL e o veículo de dispersão das amostras, bem como a formulação desenvolvida sem óleo volátil foram utilizados como controle negativo.

3.8 Atividade antioxidante

3.8.1 Reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) por espectrofotometria

A capacidade das amostras em sequestrar radicais livres foi estimada pela reação com 2,2- difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Para a realização do ensaio, diluiu-se as amostras em solução metanólica de DPPH 0,004% (Sigma-Aldrich®) no volume necessário para as concentrações de 50 e 100 µg/ml. A absorção foi determinada em equipamento de espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453, Santa Clara, EUA) no comprimento de 517 nm.

A atividade antioxidante (AA) foi estimada a partir da atividade sequestradora dos radicais livres, baseada no valor de absorção do DPPH, através da fórmula,

$$AA (\%) = 100 \times \frac{[(A_c - A_t)]}{A_c}$$

onde,

A_c refere-se à absorção do controle da reação (solução de DPPH 0,004%) e,

A_t refere-se à absorção do composto testado.

3.8.2 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A proteção da peroxidação lipídica foi avaliada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KÜLKAMP et al., 2011). O meio de reação foi composto por 100 µL da amostra nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, em tampão Tris 0,5 M (Sigma-Aldrich®). A peroxidação lipídica foi iniciada com a adição de 25 µL de solução $FeSO_4$ (Sigma-Aldrich®), 25 µL de solução de ascorbato (Sigma-Aldrich®) e 250 µL de solução de gema de ovo à 10%, em banho-maria à temperatura de 37 °C, sob leve agitação, durante 1 hora. Após o período de incubação, 500 µL de ácido tricloroacético 12% (SYNTH®) e 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,73% (Sigma-Aldrich®) foram adicionados ao meio de reação com

aquecimento à 100 °C por 30 minutos. A mistura foi então centrifugada (Centrífuga de Microtubos HT-Laboratories, modelo MCD 2000, San Diego, EUA - 12 minutos a 10.000 rpm) e o sobrenadante lido a 523 nm em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453, Santa Clara, EUA).

A proteção contra peroxidação lipídica foi expressa em atividade antioxidante (AA) em percentual, calculada da seguinte forma:

$$AA = 1 - (A_a : A_c) \times 100$$

onde,

A_a refere-se ao valor da absorção da amostra e,

A_c refere-se ao valor da absorção do controle.

3.9 Análise estatística

Para os ensaios cujo emprego da análise estatística foi necessário, utilizou-se ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey, com dados expressos como média \pm EPM. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

3.10 Descarte de resíduos

Durante o trabalho tentou-se diminuir, na medida do possível, a geração de resíduos, entretanto, os resíduos produzidos durante os experimentos foram segregados de acordo com suas características, conforme normas preconizadas pela COSAT (Comissão de Segurança do Trabalho da Faculdade de Farmácia UFRGS).

4.1 Obtenção do óleo volátil

A coleta das espécies do gênero *Stenachaenium* Benth. ocorreu nos municípios de Nova Santa Rita e Canela, no estado do Rio Grande do Sul, durante o período de idade adulta dos vegetais. O local específico de coleta, bem como o período e número do ICN estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Listagem das espécies de *Stenachaenium* Benth. coletadas no Rio Grande do Sul, informações de local, período de coleta e número de registro do Herbário ICN.

Espécie	ICN	Local da Coleta	Período de coleta
<i>Stenachaenium adenanthum</i>	190612	Canela	11/2011
<i>Stenachaenium macrocephalum</i>	-	Canela	11/2011
<i>Stenachaenium megapotamicum</i>	182557	Nova Santa Rita	03/2011
<i>Stenachaenium riedelli</i>	190611	Canela	11/2011

Folhas e inflorescências frescas, separadamente quando coletadas em quantidade suficiente, ou juntas, quando em quantidades escassas, foram submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger para obtenção do óleo volátil. A Tabela 2 apresenta o material vegetal extraído, identificação das amostras, rendimento e aspecto dos óleos voláteis obtidos de cada espécie. Calculou-se o rendimento através da relação entre o peso do material vegetal e volume de óleo extraído após 4 horas.

Tabela 2. Material vegetal extraído, rendimento e aspecto dos óleos voláteis obtidos das diferentes espécies de *Stenachaenium* Benth. coletadas.

Espécie	Identificação	Material vegetal	Rendimento (%)	Aspecto
<i>S. adenanthum</i>	SAD	Caulas, folhas e flores	1,21	Líquido amarelo e viscoso
<i>S. macrocephalum</i>	SMA	Folhas e flores	0,07	Líquido espesso amarelado
<i>S. megapotamicum</i>	SME/11	Folhas e flores	0,12	Líquido amarelo e viscoso
<i>S. megapotamicum*</i>	SME/12	Folhas e flores	0,12	Líquido amarelo e viscoso
<i>S. riedelli</i>	SRI/F	Folhas	0,07	Líquido espesso amarelado
<i>S. riedelli</i>	SRI/I	Inflorescências	0,07	Líquido espesso amarelado
<i>S. riedelli</i>	SRI/FI	Folhas coletadas no período de inflorescência	0,07	Líquido espesso amarelado

*Coleta de 2012

O teor de óleo volátil apresentou-se diferenciado entre as espécies, variando de 0,07% para as amostras provenientes da espécie *S. riedelli* - amostra de folhas (SRI/F), folhas coletadas durante o período da inflorescência (SRI/FI) e inflorescência (SRI/I) - e chegando a 1,21% para *S. adenanthum* (SAD). Uma variação importante entre as espécies também ocorreu com relação ao aspecto do óleo obtido. Em ambas as coletas de *S. megapotamicum* (coleta de 2011 – SME/11 e coleta de 2012 – SME/12) obteve-se óleo com aparência similar: líquido amarelo e viscoso. Entretanto, para as diferentes amostras da espécie *S. riedelli* (SRI) e para a amostra *S. macrocephalum* (SMA) o óleo exibiu aspecto de um líquido espesso amarelado. Sabe-se que o aspecto do óleo está intimamente relacionado às características da composição química. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, as espécies abordadas nesse estudo exibiram distinta constituição química (resultados discutidos posteriormente), justificando os diferenciados perfis. SDA demonstrou rendimento de óleo superior às demais. É importante considerar que esta espécie exibe características botânicas diferenciadas macroscopicamente, como pode ser verificado na Figura 5, principalmente com relação ao tamanho, considerando que as espécies SME, SMA e SRI são arbustos de grande porte.

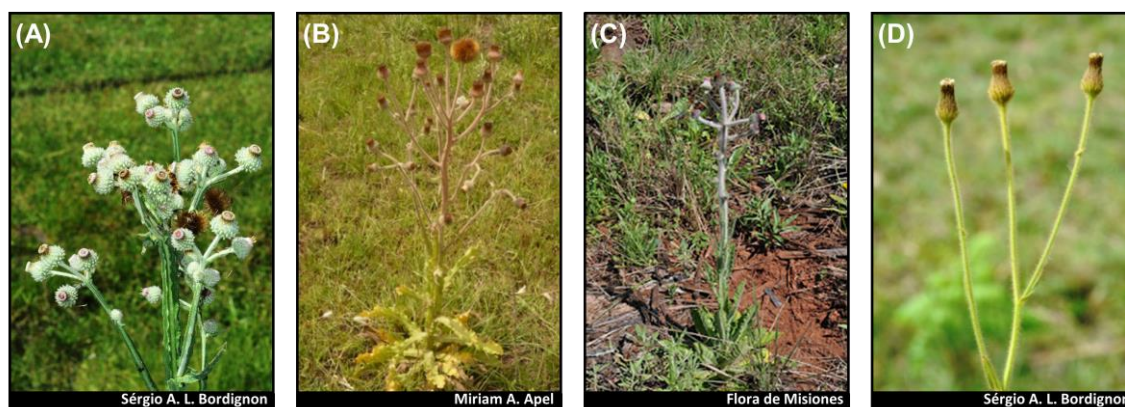


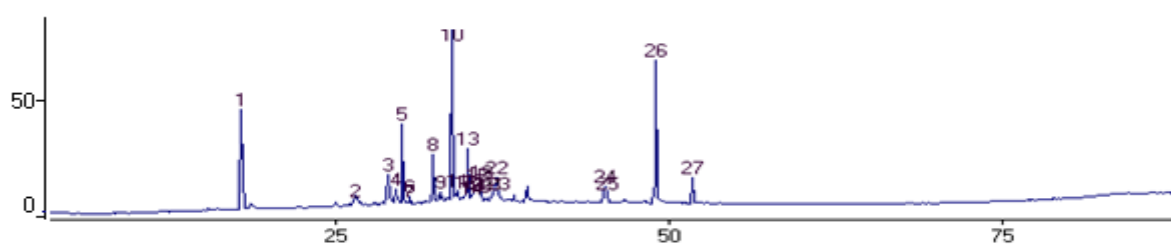
Figura 5. Diferentes espécies de *Stenachaenium*: (A) *S. megapotamicum*, (B) *S. riedelli*, (C) *S. macrocephalum* e (D) *S. adenanthum*.

Cabe ressaltar que a sazonalidade dessas espécies conduziu a coleta ao período de idade adulta dos indivíduos, como descrito, no verão para SME e primavera para as outras espécies. Durante essas estações, no decorrer do estudo, houve intensa escassez de chuvas, afetando seriamente seu desenvolvimento e, em alguns casos, impossibilitando a coleta e, conseqüentemente, a obtenção de quantidades maiores de amostra, limitando a realização de alguns ensaios.

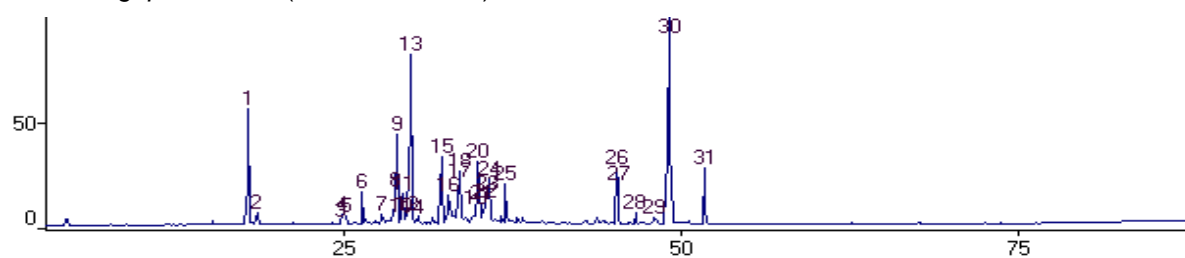
4.2 Análise química do óleo volátil

Para a identificação e quantificação dos constituintes, os óleos voláteis obtidos foram submetidos a análise em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas. Os cromatogramas provenientes de cada amostra estão ilustrados na Figura 6.

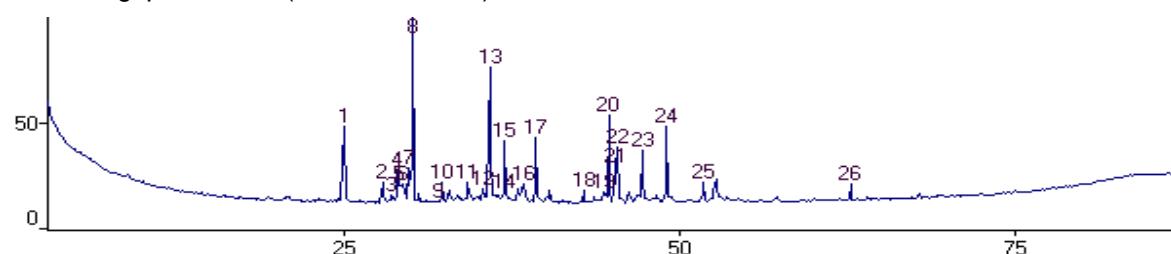
Um total de 64 compostos foram identificados para os óleos voláteis das diferentes espécies de *Stenachaenium* Benth. (Tabela 3). Em geral, com relação aos terpenos, houve predominância de sesquiterpenos, principalmente oxigenados, e porcentagens muito baixas de monoterpenos, sendo que a fração hidrocarbonada destes não foi visualizada. Em algumas amostras, quantidades significativas de compostos alifáticos foram observadas, variando conforme a espécie.



A – *S. megapotamicum* (Coleta em 2011)



B – *S. megapotamicum* (Coleta em 2012)



C – *S. adenantum*

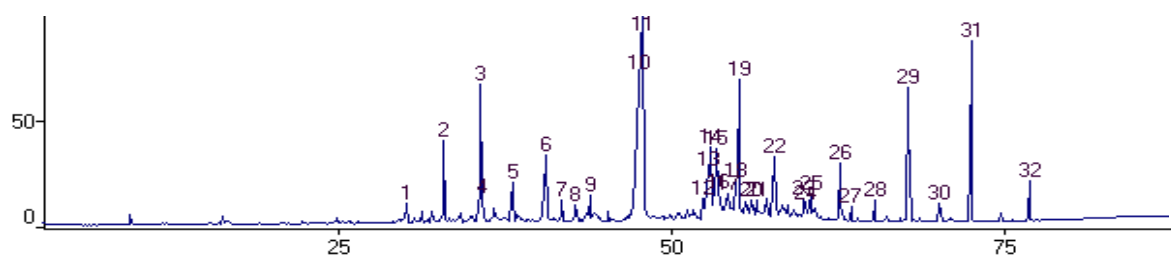
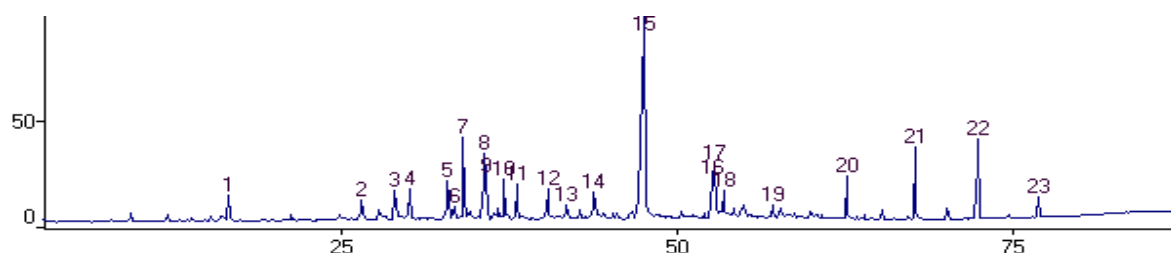
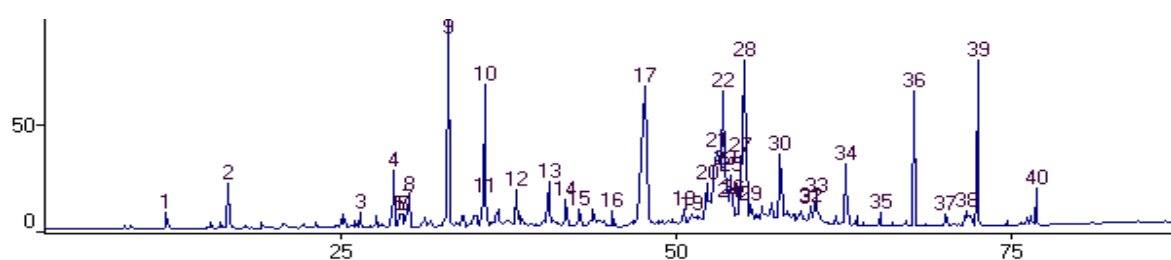
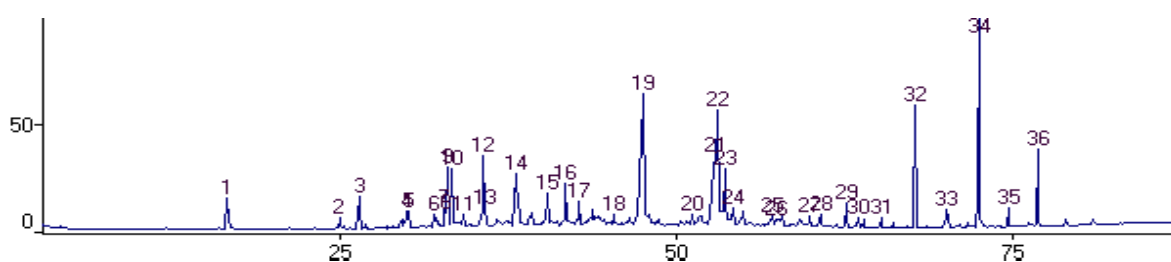
D – *S. riedelli* (Folhas coletadas durante o período da inflorescência)E – *S. riedelli* (Inflorescências)F – *S. riedelli* (Folhas)G – *S. macrocephalum*

Figura 6. Cromatogramas obtidos por CG/EM para análise da composição química do óleo volátil das diferentes espécies de *Stenachaenium* Benth.

Para SME/11, 84,1% dos constituintes foram identificados. Desses, a fração terpenoídica totalizou 65,6%, com 52,6% de sesquiterpenos. Os monoterpenos apresentaram-se como a fração menos representativa (13%), na qual monoterpenos hidrocarbonados não foram observados. Na fração monoterpênica oxigenada, timol (10,8%) foi o composto majoritário. Sesquiterpenos oxigenados foram os terpenoides com o maior número de constituintes, entre os quais, fokienol foi o mais

abundante (24,4%), seguido de γ -eudesmol (5,9%) e (*E*)-nerolidol (5,8%). Para a fração de sesquiterpenos hidrocarbonados, β -bisaboleno (9%), foi o constituinte mais representativo. Além desses compostos, o óleo apresentou significativa quantidade de um derivado de cumarina, 2*H*-1-benzopiran-2-one, 7-(3-metilbutoxi) (17,9%).

A amostra da mesma espécie coletada em 2012 (SME/12) exibiu composição química semelhante, com 76,2% dos compostos identificados. A fração sesquiterpênica apresentou-se também como predominante, entretanto, com aumento de sesquiterpenos hidrocarbonados (19,54%), destacando-se β -bisaboleno como composto majoritário desse grupo, enquanto que a fração oxigenada não apresentou compostos em quantidade significativa. Com relação aos monoterpenos, timol (7,16%) foi o único representante observado. As principais diferenças com relação à coleta anterior referem-se ao aumento da concentração do composto derivado de cumarina, 2*H*-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi) (24,08%), seguindo de expressiva quantidade de um derivado de ionona (6-metil- γ -(*E*)-ionona), com 7,46% e redução importante de fokienol, majoritário na coleta de 2011, e que, neste caso, representou apenas 3,28% dos constituintes identificados.

As diferenças de composição química dos óleos voláteis da espécie SME podem estar relacionadas aos fatores edafoclimáticos aos quais os indivíduos estavam submetidos. É sabido que fatores ambientais, tais como insolação, umidade e condições do solo afetam seriamente a produção de metabólitos secundários, influenciando no conteúdo e composição química do óleo volátil (RAYMUNDO et al., 2011).

Semelhante à composição química das amostras SME/11 e SME/12, o óleo volátil de SAD foi caracterizado pela presença de quantidades importantes de terpenos, entretanto apenas sesquiterpenos (37,78%) e quantidade pouco significativa de compostos alifáticos (7,35%), exibindo ácido hexadecanóico (5,08%) como representante desse grupo químico em quantidade mais pronunciada. É

Contin. (Tabela 3)								
1905	Heptadecanal			0,36			0,48	
1976	Ácido Hexadecanóico			23,85	39,90	46,87	19,16	5,08
2021	2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi)	17,95	24,08					7,35
2087	Heneicosano			0,38			0,29	
2140	Heneicosanol				4,59	5,81		
2142	NI2			10,32				
2147	NI3				5,50			
2151	NI4			12,89				2,77
2163	NI5							6,66
2169	Ácido Octadecanóico			3,07	0,70	1,11	2,05	
2190	Docosano			0,56	0,75		0,57	
2218	NI6				6,06			
2220	NI7							8,57
2292	Tricosanol					1,01		
2295	Tricosano			0,31				
2393	Tetracosano			0,35	0,62		0,44	
2422	Tetracosanal			0,34				
2490	Pentacosano			0,99	1,93	2,52	2,15	1,49
2522	Pentacosanal			0,37	0,37			
2592	Hexacosano			0,33	0,61		0,43	
2695	Heptacosano			6,26	5,20	4,35	5,61	
2790	Octacosano			0,65	0,50		0,29	
2896	Nonacosano			12,31	7,74	4,96	7,31	
2988	Triacotano			0,85				
3092	Untriacontano			3,68	1,37	1,15	1,35	
Total de compostos identificados		84,1	76,2	87	74,9	92,8	69,6	72,2

IR: Índice de retenção em coluna DB5; SME/11: *S. megapoticum* coletada em 2011; SME/12: *S. megapoticum* coletada em 2012; SMA: *S. macrocephalum*; SRI/FI: *S. riedelli* (Folhas coletadas no período de inflorescência); SRI/I: *S. riedelli* (Inflorescências); SRI/F: *S. riedelli* (Folhas); SAD: *S. adenanthum*. NI: compostos não identificados. **NI1** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(36) 65(27) 77(41) 91(56) 105(42) 121(38) 131(23) 145(32) 161(26) 171(50) 176(36) 199(6) 217(51) 232(23)]; **NI2** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(75) 69(31) 81(45) 95(47) 107(26) 119(18) 135(10) 135(4) 150(2) 280(3);] **NI3** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(57) 67(46) 79(52) 95(23) 108(15) 121(5) 135(4)]; **NI4** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(49) 67(52) 79(65) 93(26) 108(19) 121(7) 135(5) 149(2) 222(2)]; **NI5** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(23) 69(77) 81(31) 93(25) 107(13) 119(13) 133(6) 147(4) 161(4) 187(2) 203(2)]; **NI6** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(75) 69(31) 81(45) 95(47) 107(26) 119(18) 135(10) 150(9) 161(4) 187(3) 203(2)]; **NI7** [m/z (int. rel.): 41(100) 55(73) 67(32) 81(45) 95(45) 107(26) 119(22) 133(10) 150(7) 187(3) 202(1)].

importante ressaltar que apenas nessa espécie, além de SME, foi observada a presença do derivado de cumarina, 2*H*-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi), com 7,35%. Butilato de hidroxitolueno (BHT) apresentou-se como majoritário (16,45%), entretanto, sabe-se que esta substância provém do solvente (éter etílico) utilizado na diluição do óleo para a leitura. Na fração de sesquiterpenos hidrocarbonados, β -elemeno foi o constituinte mais representativo (6,55%), enquanto que a fração oxigenada apresentou pogostol (14,09%), seguido de α -bisabolol (5,81%) como constituintes em quantidades importantes. O composto 6-metil- γ -(*E*)-ionona (3,9%) também foi identificado nesta espécie como minoritário.

A espécie SRI foi a única que possibilitou a extração isolada do óleo volátil de diferentes órgãos do vegetal. Com relação à composição química, em todas as amostras observou-se a presença significativa de compostos alifáticos. Assim, SRI/FI exibiu predominância desses compostos (69,64%), sendo o ácido hexadecanóico o majoritário (39,9%), seguido de nonacosano (7,74%) e heptacosano (5,2%). Apenas 9,36% dos constituintes identificados representavam terpenos. Esse reduzido percentual envolve três sesquiterpenos oxigenados: β -eudesmol (5,75%), óxido de cariofileno (2,77%) e pogostol (0,84%). Nesta espécie não foram observados monoterpênicos e sesquiterpenos hidrocarbonados. Da mesma forma, para o óleo volátil de SRI/I compostos alifáticos representaram a maior fração de constituintes identificados, totalizando 74,14%. Nesse caso, ácido hexadecanóico também foi o majoritário, com 46,87%, seguido de heneicosanol (5,81%) e nonacosano (4,96%). A fração terpenica foi representada apenas por sesquiterpenos, sendo 0,73% de hidrocarbonados e 15,47% oxigenados, com β -atlantol (6,34%) como constituinte mais representativo, seguido de β -eudesmol (4,02%). Para o óleo obtido das folhas dessa espécie (SRI/F) foram identificados 69,6% dos compostos. Similarmente às outras amostras, houve a predominância de compostos alifáticos (45,69%) e o ácido hexadecanóico manteve-se como constituinte majoritário, entretanto, em menor quantidade (19,16%), seguido de nonacosano (7,31%) e heptacosano (5,61%). A classe terpenoídica, foi representada principalmente por três sesquiterpenos oxigenados (19,31%): óxido de cariofileno, como mais abundante (11,70%), β -eudesmol (6,67%) e em quantidade pouco significativa, pogostol (0,94%). β -bisaboleno e 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno foram os únicos sesquiterpenos hidrocarbonados, identificados em quantidades minoritárias: 0,64% e 0,46%, respectivamente. O composto derivado de ionona, 6-metil- γ -(*E*)-ionona (1,92%), também foi observado nessa amostra.

Similarmente às diferentes amostras provenientes da espécie SRI, a composição química de SMA apresentou como constituintes majoritários compostos alifáticos. De 87% dos constituintes identificados, ácido hexadecanóico representou 23,85%, seguido de nonacosano (12,31%) e heptacosano (6,26%). Sesquiterpenos também foram identificados no óleo volátil desta espécie, porém em quantidades pouco significativas, sendo β -eudesmol o constituinte mais representativo da fração oxigenada (3,26% do total de 11,47%), enquanto que para a fração hidrocarbonada,

foi observada apenas a presença de β -bisaboleno e 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno, com 0,78% e 1,32%, respectivamente.

Os principais compostos identificados no óleo volátil obtido das diferentes espécies de *Stenachaenium* Benth. estão representados esquematicamente na Figura 7, de acordo com a classificação química.

A composição química das espécies está intimamente relacionada com o aspecto do óleo volátil. Como descrito anteriormente, o óleo de ambas as amostras de SME (SME/11 e SME/12) e de SAD apresentaram-se com aspecto viscoso e cor amarela. Entretanto, o óleo de SMA e das amostras de SRI (SRI/F, SRI/FI e SRI/I) exibiram um aspecto de líquido espesso, devido a quantidades importantes de compostos alifáticos, principalmente ácido hexadecanóico.

Compostos alifáticos são comumente observados na constituição química de óleos voláteis. A presença de ácido hexadecanóico é frequentemente descrita na literatura em quantidades variadas, mas em geral, pouco significativas (TOMCZYKOWA et al., 2011). Autores descreveram esse composto como constituinte de ceras epicuticulares nos vegetais (REVERCHON; SENATORE, 1994; PANSARIN; SALATINO; PEREIRA, 2008), e por esse motivo podem ser obtidos juntamente com o óleo volátil durante o processo extrativo. Na família Asteraceae quantidades importantes dessa substância foram descritas para o óleo de *Centaurea cuneifolia* e *C. euxina*: 17,6% e 20,3%, respectivamente (ROSSELLI et al., 2009). *Aster hesperius* A. Gray também apresentou concentrações importantes desse ácido na composição química do óleo volátil (29,6%) (TABANCA et al., 2007). Saïdana e colaboradores (2008) observaram que o composto representava 18,14% dos constituintes identificados no óleo volátil das partes aéreas de *Tamarix boveana* Bunge obtido por destilação a vapor, e, nesse caso, em torno de 28% do total eram ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, além de 18 a 34% de hidrocarbonetos, variando conforme o órgão do vegetal.

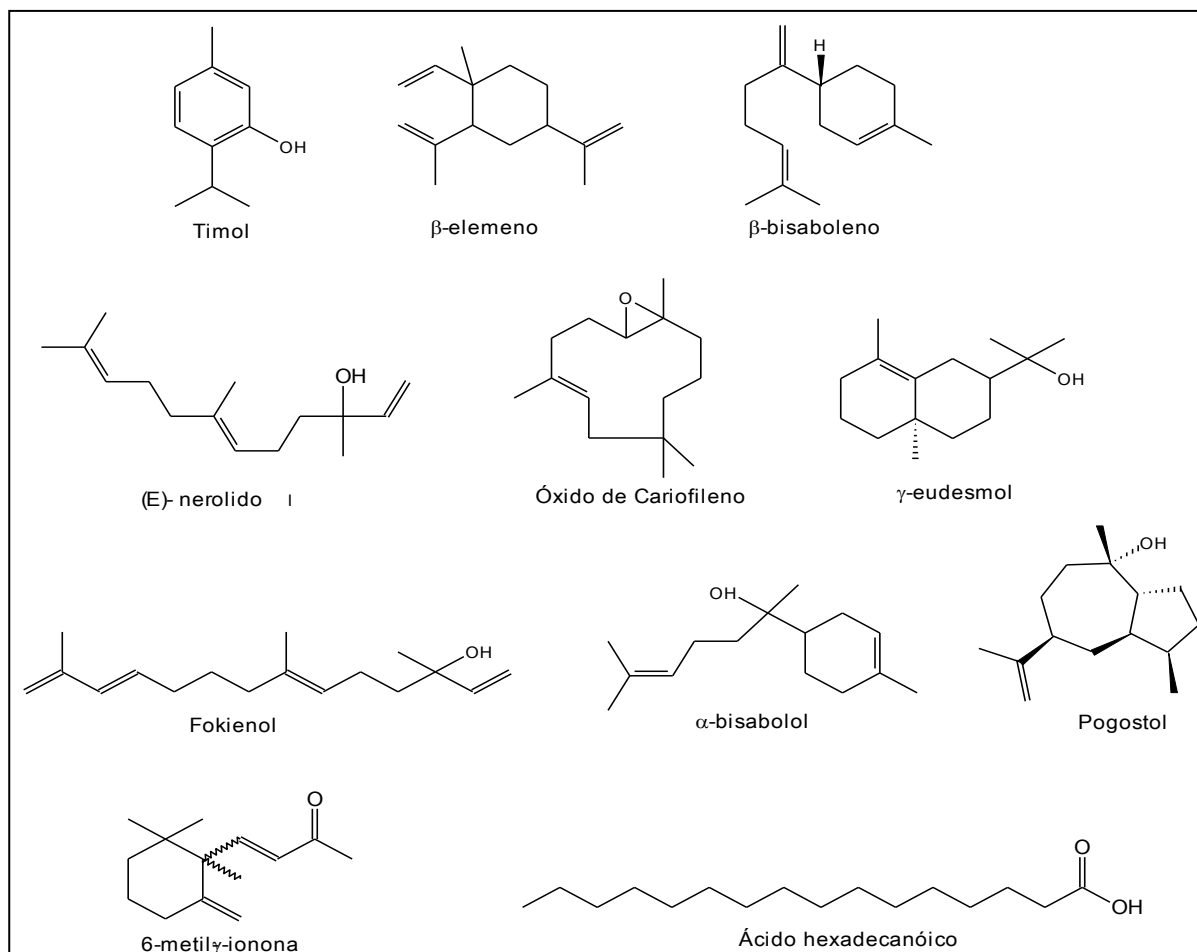


Figura 7. Estrutura química dos principais compostos de cada grupo químico identificados no óleo volátil das diferentes espécies de *Stenachenium* Benth: monoterpenos oxigenados (timol); sesquiterpenos hidrocarbonados (β -elemeno e β -bisaboleno); sesquiterpenos oxigenados ((*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno, γ -eudesmol, fokienol, α -bisabolol e pogostol), compostos alifáticos (ácido hexadecanóico) e o derivado ionona (6-metil- γ -ionona).

A ocorrência de fokienol, (*E,E*)-farnesa-1,6,9,11-tetraen-3-ol, um álcool da classe dos sesquiterpenos e constituinte majoritário do óleo volátil de SME/11, foi relatada para óleo volátil de outras espécies da família Asteraceae, entretanto em quantidade menores, como observado para SME/12 (TABANCA et al., 2007; HAQUI et al., 2011). O óleo das partes aéreas de *Tanacetum fruticosum* Ledeb., por exemplo, apresentou 0,3% dessa substância (WEYERSTAHL et al., 1999), e *Phlomis armeniaca* Willd. apenas 0,2% (DEMIRCI et al., 2009). Quantidades significativas desse composto foram descritas para o óleo volátil de *Dittrichia viscosa* Greuter, para o qual Camacho e colaboradores (2000) relataram 38,8%, na Espanha. Na Jordânia, partes aéreas da mesma espécie apresentaram fokienol como majoritário com 20,87%, seguido de (*E*)-nerolidol (19,75%) e β -eudesm-6-en-4 α -ol (5,64%). Nesse estudo, ainda, semelhantemente ao observado para o óleo de

SME/11, a fração de sesquiterpenos oxigenados também foi predominante (77,15%) (AL-QUDAH et al., 2010). Blanc e colaboradores (2006), na França, observaram um grande número de sesquiterpenos oxigenados no óleo volátil obtido da mesma espécie, e fokienol apresentou-se com 21,1% do óleo total, seguido de (*E*)-nerolidol (8,6%) e eudesm-6-en-4 α -ol (6,2%). O mesmo ocorreu no Vietnã, onde os autores observaram 24-26% de fokienol, e relacionaram nesta planta, a presença desse álcool com a grande quantidade de (*E*)-nerolidol (35,5%) (LESUEUR et al., 2006). Na constituição química de ambos os óleos voláteis de SME também observou-se a presença de (*E*)-nerolidol, entretanto em quantidades menores (5,84% e 4,19%, respectivamente para SME/11 e SME/12).

A presença de pogostol, sesquiterpeno oxigenado, majoritário para o óleo volátil de SAD (14,09%) é pouco relatada na literatura. Entretanto, exceto em SME/11, foi observado em todas as amostras como constituinte minoritário. Esse composto é descrito no óleo volátil de espécies do gênero *Pogostemon* (Lamiaceae) inclusive como um marcador de quimiotipo (PAUL et al., 2010; BLANK et al., 2011). Pogostol também foi observado no óleo volátil de *Eriocephalus punctulatus* DC. (Asteraceae), em quantidades de até 15,9% (SANDASI; KAMATOU; VILJOEN, 2011). Na família Apiaceae, o óleo de *Heracleum transcaucasicum* Manden. apresentou 8,2% desse composto (FIRUZI et al., 2010). Um dos primeiros estudos relacionado à atividade biológica dessa substância descreveu importante atividade antiemética (YANG et al., 1999). Esquemáticamente, Deguerry e colaboradores (2006) adaptaram parte do mecanismo de biossíntese dos sesquiterpenos sugerido por Croteau (1987) para rota biossintética de compostos provenientes do óleo volátil de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e sugerem uma via de formação do pogostol. Assim, conforme a Figura 8, a ionização inicial de FPP resulta em um carbocátion em C₁ que se liga ao carbono C₁₀, formando o cátion germacradienila, que posteriormente é desprotonado, gerando germacreno A, precursor de sesquiterpenos com esqueleto guaiano, incluindo pogostol.

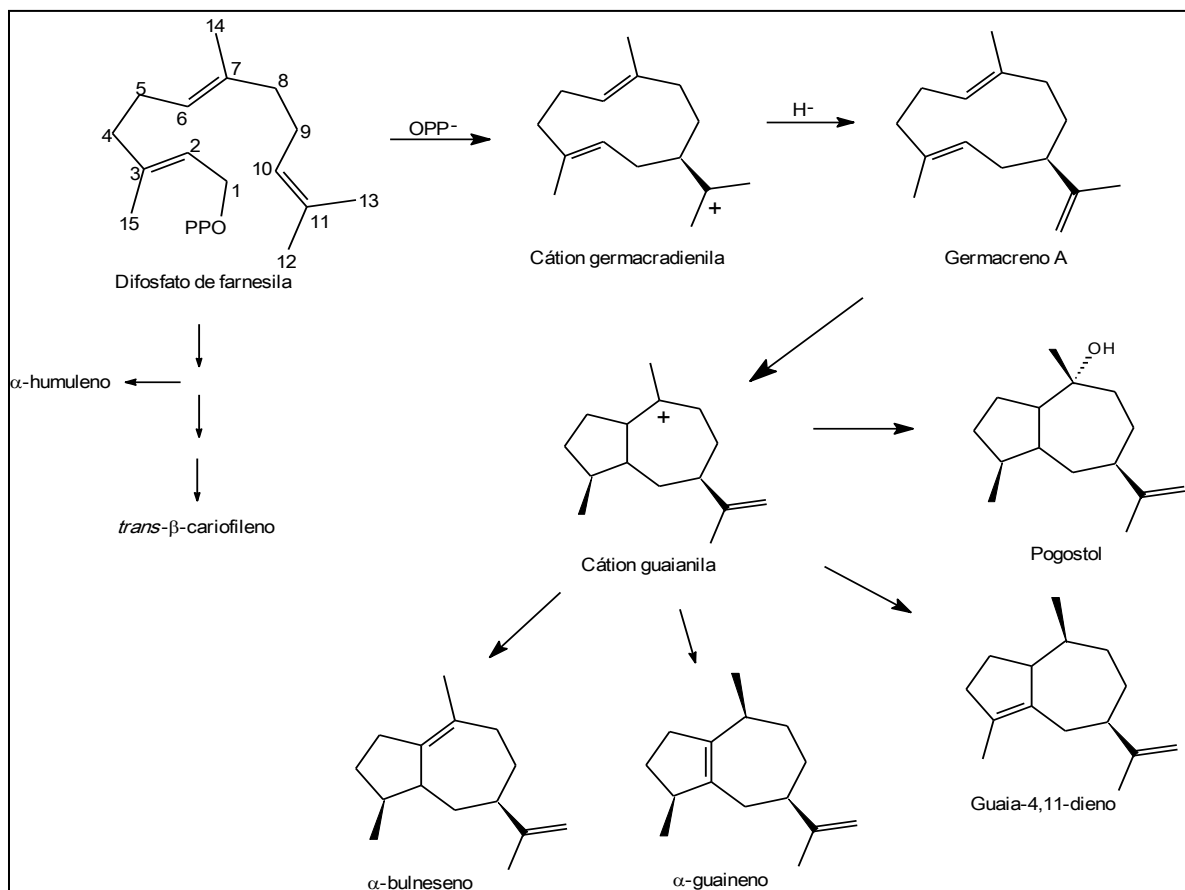


Figura 8. Via de formação de sesquiterpenos a partir de pirofosfato de farnesila para o óleo volátil de *Pogostemon cablin* (DEGUERRY et al., 2006)

Cumarinas simples, como 2-H-1-benzopirano-2-ona ou seus derivados são frequentemente reportadas em óleos voláteis de outras espécies vegetais, incluindo indivíduos da família Asteraceae, entretanto em quantidades pouco significativas. Tschiggerl e Bucar (2012) observaram aproximadamente 6% de cumarina simples na fração volátil de *Matricaria recutita* L. e, Wang e colaboradores (2009) reportaram quantidades similares (6,36%) para o mesmo composto no óleo volátil de espécies de *Cinnamomum*. Schossler e colaboradores (2009), explicaram que a presença de cumarina simples no óleo de *Eupatorium laevigatum*, é consistente com a quimiotaxonomia da família Asteraceae devido à tendência desta família em apresentar derivados do chiquimato e também devido a este grupo de plantas apresentarem-se como os maiores produtores de cumarina entre as angiospermas.

Como observado para as amostras SME/11 e SME/12, a ocorrência em quantidades significativas para compostos derivados de cumarina é descrita também para outras famílias botânicas. Cumarina é um composto que ocorre em muitas

plantas conhecidas popularmente como cinamomum e lavanda, contudo, a quantidade obtida depende do método de extração. Por exemplo, o conteúdo volátil das partes aéreas *Melittis melissophyllum* L. obtido pelo método de microextração de fase sólida e *headspace* apresentou de 44,2% e 69,7% de cumarinas, respectivamente (MAGGI et al., 2011). Para o total de componentes voláteis de *Angelica dahurica* (Fisch.) Benth. & Hook. f., obtidos por fluido supercrítico, aproximadamente 20% eram derivados dessa classe (CHEN et al., 2008). Sementes de três espécimes de *Copaifera langsdorffii* Desf. apresentaram cerca de 4%, 7% e 12,6% de cumarina no óleo volátil (NASCIMENTO et al., 2012). Quantidades significativas e de diferentes derivados de cumarina foram isolados de espécies do gênero *Pterocaulon*, também pertencente à família Asteraceae e tribo Inuleae, e por isso, relacionado diretamente ao gênero *Stenachaenium* (MAES, DEBENEDETTI, KIMPE, 2006; STEIN et al., 2006). Essa relação taxonômica pode justificar a presença de importantes quantidades de cumarina nas espécies SME e SAD.

A ocorrência dessas substâncias nessa classe de metabólitos secundários acontece em virtude de sua alta volatilidade, entretanto, não foram encontrados relatos na literatura da presença, especificamente de 2*H*-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi) em óleo volátil, ou de quantidades tão significativas de cumarina pelo método empregado.

Adams (2009) reporta a presença de alguns derivados de cumarina em óleos voláteis. A partir do espectro de massas descrito por esse autor para tais substâncias e informações de literatura (CORDA et al., 1998; CONCANNON; RAMACHANDRAN; SMYTH, 2000) associadas ao espectro obtido para o composto (Figura 9) e suas fragmentações, chegou-se a proposta do derivado 2*H*-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi). A visualização de uma mancha fluorescente de cor amarela sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm, é considerada outro indício para confirmação desse composto, já que cumarinas apresentam a propriedade de fluorescência sob ação da luz UV, principalmente nas cores azul, amarela ou roxa, de acordo com a posição dos grupos substituintes (BRAND et al., 1997). Em virtude da quantidade reduzida de material vegetal e baixo rendimento de obtenção do óleo volátil, ainda não foi possível o isolamento deste composto para a avaliação por técnicas específicas, como ressonância magnética nuclear (RMN) ou

infravermelho (IV). Entretanto, novas coletas serão realizadas a fim de isolá-lo e confirmar essa proposta.

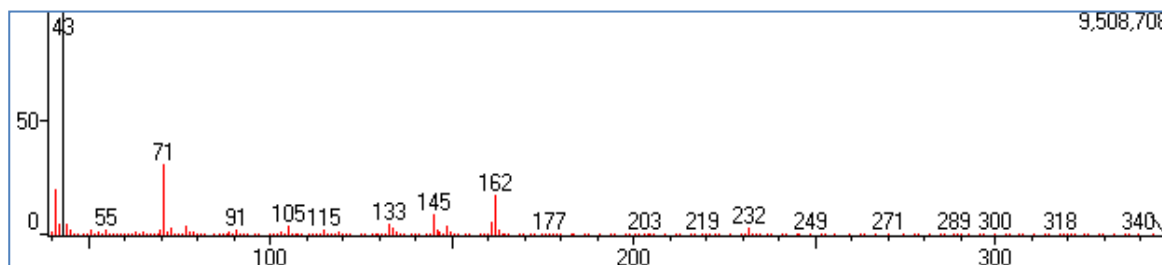


Figura 9. Espectro de massas do composto 2H-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi), obtido por CG/EM (Equipamento Shimadzu QP5000). [m/z (int. rel.): 43(100) 55(1) 71(30) 91(2) 105(4) 115(2) 133(5) 145(9) 162(17) 232(3)].

Assim, a partir do espectro de massas obtido por CG/EM, propôs-se algumas possibilidades de fragmentação da estrutura relacionada aos principais picos dessa substância (Figura 10).

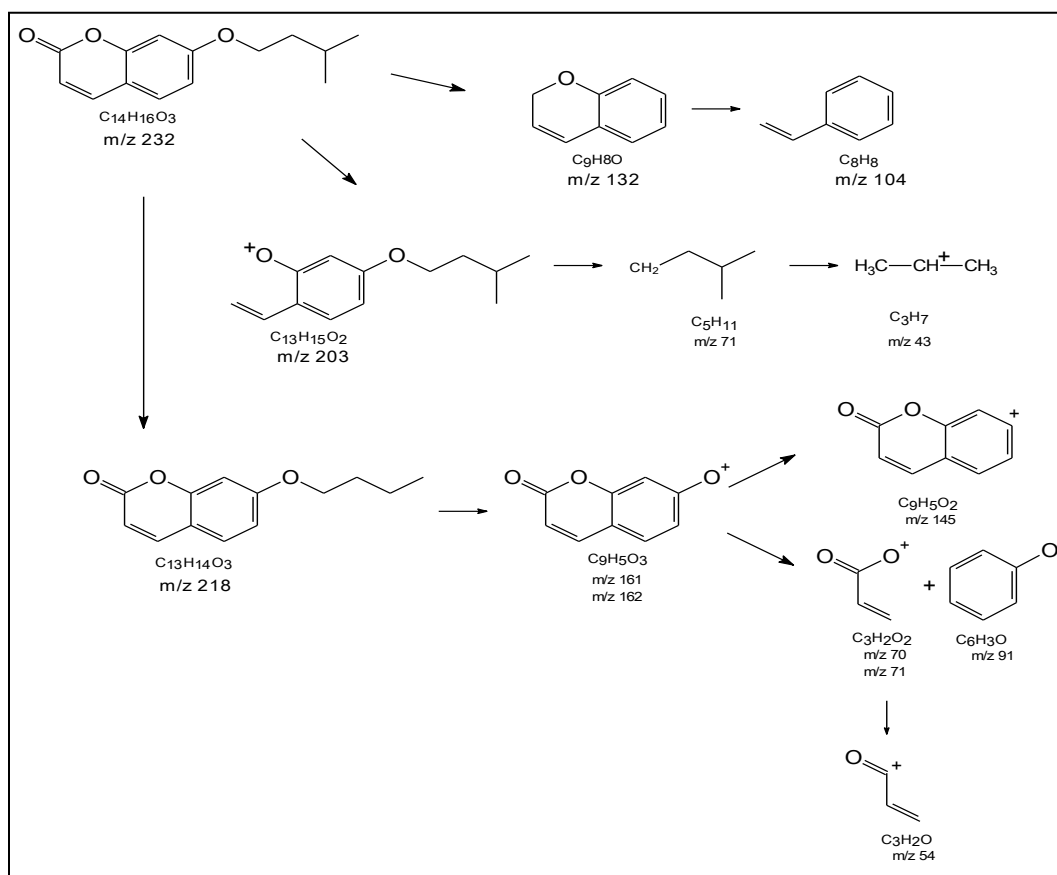


Figura 10. Possibilidades de fragmentação do derivado cumarínico 2H-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi), relacionadas aos principais picos visualizados no espectro de massas obtido por CG/EM.

O composto 6-metil- γ -(E)-ionona, um dos principais constituintes do óleo volátil de SME/12 (7,46%) e minoritário nas amostras SME/11, SRI/I, SRI/F e SAD, é

um derivado do grupo químico ionona e pertence a uma classe de compostos provenientes da conversão de constituintes não voláteis, mas que contribui com frequência para o sabor de frutas. Esses compostos podem ser encontrados em óleos voláteis quando a extração ocorre por destilação a vapor. O grupo das iononas é considerado o principal C_{13} -*nor*-isoprenóides, uma classe de compostos decorrentes da degradação de terpenos. Nesse caso, são provenientes da autoxidação de carotenos (VINHOLES; COIMBRA; ROCHA, 2009; YU; BEYER, 2012). Os derivados de carotenóides, como as iononas e damasconas constituem o aroma observado em vinhos, rosas, tabaco e chá, e por isso a indução de sua síntese a partir de carotenos é uma técnica amplamente investigada (DIONÍSIO; CARVALHO; PASTORE, 2009). Estudos relatam que o catabolismo de carotenóides está envolvido com mecanismos de defesa da planta. A produção de β -ionona, por exemplo, principal representante dessa classe, está relacionada com a interação planta-inseto (HANNOUFA; HOSSAIN, 2012). É importante considerar que os carotenos são provenientes da mesma via metabólica dos outros terpenos, o que pode justificar a presença de um produto derivado no óleo volátil obtido das espécies de *Stenachaenium*.

4.3 Desenvolvimento da nanoemulsão

Os sistemas nanométricos representam uma viável e eficiente alternativa para melhorar a estabilidade física de substâncias ativas e preservá-las da influência de fatores ambientais. Além de proteger o óleo contra evaporação e degradação, e devido ao tamanho subcelular, esse sistema pode aumentar sua absorção celular por mecanismos passivos, reduzindo a resistência e aumentando a atividade antimicrobiana (DONSÌ et al., 2011). A partir desse pressuposto desenvolveu-se nanoemulsões – apenas com o óleo volátil *S. megapotamicum* (SME/11) em virtude da pequena quantidade de amostra obtida – com a finalidade de avaliar comparativamente ao óleo livre a resposta às atividades biológicas posteriormente submetidas.

Para a preparação da formulação empregou-se a técnica de emulsificação espontânea. Esse método consiste basicamente na adição de uma fase oleosa,

contendo, além do óleo, um solvente orgânico miscível em água, à fase aquosa, adicionada de um tensoativo, sob agitação e temperatura moderadas, com posterior remoção do solvente através de sistemas de evaporação.

O desenvolvimento de nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea tem sido frequentemente descrito na literatura. Através desse método é possível preparar formulações com propriedades similares às aquelas obtidas por métodos físicos, com a vantagem de uma técnica simples, de baixo custo, rápida e que possibilita o emprego de pequenas quantidades de material e baixa temperatura (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008), fatores decisivos na escolha do método para o desenvolvimento da formulação em estudo.

As formulações desenvolvidas foram submetidas aos ensaios biológicos. Para o ensaio de atividade antifúngica, avaliou-se a Nanoemulsão A (Tabela 5) com concentração de óleo volátil de 0,332 mg/mL, determinada previamente por avaliações relacionadas ao teste de atividade antifúngica. Concomitantemente, desenvolveu-se uma formulação controle em igual processo e quantidade dos excipientes, substituindo-se o óleo volátil por TCM.

Tabela 4. Características das nanoemulsões utilizadas nos ensaios biológicos.

	Nanoemulsão A	Nanoemulsão B
Formulação	Concentração do óleo: 0,332 mg/mL Excipientes: Água (53 mL) Polissorbato (0,07 mL) Etanol (27 mL)	Concentração do óleo: 0,332 mg/mL Excipientes: Água (53 mL) Polissorbato (0,07 mL) Etanol (27 mL) TCM (160 µL)
Método de evaporação do solvente	Não evaporado	Banho-maria com temperatura até 40 °C
Tamanho de Partícula	210 nm	86,66 nm
Índice de Poldispersão	0,369	0,068
pH	5,04 ± 0,02	4,75 ± 0,02
Teor	77,6 ± 1,28	98,6 ± 1,82
Aspecto	Emulsão translúcida; ausência de separação de fases e precipitado	Emulsão leitosa; ausência de separação de fases e precipitado
Aplicação no estudo	Atividade antifúngica	Atividade antiqumiotóxica e antioxidante

A Nanoemulsão B (Tabela 5) foi submetida aos ensaios de atividade antioxidante e antiqumiotóxica. O sistema continha igual concentração do óleo volátil (0,332 mg/mL) e quantidade dos excipientes, entretanto, adicionou-se à fase

oleosa 160 μL de triglicerídeos de cadeia média do ácido cáprico/caprílico (TCM) e submeteu-se o sistema à evaporação do solvente pelo sistema de banho-maria à 40 °C.

Como informação adicional, partindo de valores reduzidos de teor para as formulações submetidas aos diferentes processos de evaporação no início do estudo (35% e 77% para rota evaporador e banho-maria à 40 °C sob agitação, respectivamente), avaliou-se a adição de TCM à formulação padrão e observou-se aumento importante no teor de óleo volátil no sistema, com valores de 62% e 98% para os dois métodos de evaporação testados. Esses resultados confirmam que a pressão exercida pelo sistema de rotaevaporação leva ao aumento na perda do óleo volátil contido no sistema, e que a adição de um óleo fixo foi capaz de reduzir a volatilização. Outros estudos descrevem teores próximos aos obtidos para nanoemulsão contendo óleo volátil (FLORES et al., 2011), entretanto, essa propriedade varia de acordo com a composição da formulação e a quantidade de cada constituinte.

As propriedades obtidas para ambas as formulações (Nanoemulsão A e B) contendo o óleo volátil de SME/11 são compatíveis com valores reportados por outros autores para formulações com características similares (FLORES et al., 2011), variando apenas no teor do óleo no sistema.

A aparência translúcida exibida pela nanoemulsão A é relacionada a formulações com pequenos tamanhos de partícula (FORGIARINI et al., 2001; BOUCHEMAL et al., 2004; CAPEK, 2004; RAO; MCCLEMENTS, 2012). Em relação à nanoemulsão B, a alteração no aspecto da formulação refere-se à adição TCM. Como já descrito, a adição de TCM foi realizada no intuito de diminuir a volatilização do óleo e resultou no aspecto leitoso, comumente relatado para nanosistemas com essa composição química.

Salvia-Trujillo e colaboradores (2013) descrevem que o índice de polidispersão próximo a 1 indica distribuição heterogênea de tamanho de partícula e Flores e colaboradores (2011) relatam que uma homogeneidade do sistema ocorre quando os valores desse índice estão abaixo de 0,25. Assim, apenas a

nanoemulsão B (índice de polidispersão de 0,068) apresentou-se adequadamente homogênea.

O pH de ambas as formulações apresentou-se levemente ácido, provavelmente devido ao pH do óleo volátil, que exibiu valores próximos à 4,5. Considerando o pH da pele (4,6 - 5,8) uma formulação adequada para uso tópico deve ser levemente ácido (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). Valores determinados de pH estão estabelecidos apenas para nanocapsulas, entre 3,0 e 7,5, quando utilizados métodos de nanoprecipitação, emulsão-difusão ou camada-por-camada são aplicados. O pH do meio de dispersão também pode ser um fator importante no controle de tamanho de nanopartículas e de sua biodistribuição (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Nanoemulsões têm sido amplamente descritas com aplicações dérmicas por apresentar algumas vantagens sobre outras formulações. A necessidade de pequenas concentrações de surfactante resulta na redução do tamanho de partícula e na fluidez do sistema, aumentando a penetração da substância ativa (BOUCHEMAL et al., 2004). Um estudo de Dias e colaboradores (2012), mostrou um efeito parcialmente protetor de um sistema nanoemulsionado contendo β -cariofileno, um sesquiterpeno frequentemente encontrado na composição de óleos voláteis, contra a hidrólise ácida, exposição a irradiação UV-A, condições oxidativas (H_2O_2) e termolíticas (60 °C). A encapsulação de cânfora, citronelal, eucaliptol, limoneno e mentol, com diferentes polímeros foi realizada na tentativa de controlar e melhorar a liberação dessas substâncias (SANSUKCHAREARNPON et al., 2010).

Esses estudos indicam a importância de um sistema capaz de proteger a substância ativa de fatores ambientais, entretanto, sem influenciar na sua atividade e apenas potencializá-la, e vários esforços estão sendo realizados com essa proposta (NUCHUCHUA et al., 2009; KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010; WEN et al., 2010; ZIANI et al., 2011).

4.5 Atividade antifúngica

O ensaio para avaliação de atividade antifúngica foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos padronizados pelo CLSI. Para o óleo volátil de SME/11 partiu-se de um *screening* que contemplava cepas filamentosas e leveduriformes, enquanto que no ensaio para SME/12, SRI/F e SRI/FI apenas empregou-se fungos filamentosos devido à escassez de amostra.

SME/11 e timol foram investigados contra 11 espécies fúngicas e ambos exibiram atividade seletiva contra fungos filamentosos, inibindo o crescimento de *E. floccosum*, *T. rubrum* e *S. dimidiatum* na concentração de 500 µg/mL (Tabela 6). Nesse *screening* todos os isolados de espécies de *Candida* demonstraram resistência.

Tabela 5. *Screening* contra fungos filamentosos e leveduriformes do óleo volátil das diferentes espécies de *Stenachaenium* e timol.

Microrganismo	Timol	SME/11	SME/12	SRI/FI	SRI/F
<i>Candida albicans</i> CA02	R	R	Nt	Nt	Nt
<i>Candida krusei</i> CK04	R	R	Nt	Nt	Nt
<i>Candida glabrata</i> CG01	R	R	Nt	Nt	Nt
<i>Candida tropicalis</i> CT56	R	R	Nt	Nt	Nt
<i>Candida parapsilosis</i> CPA134	R	R	Nt	Nt	Nt
<i>Epidermophyton floccosum</i> EPF07	Fungistático	Fungicida	Fungistático	R	Fungistático
<i>Epidermophyton floccosum</i> EPFW4	nt*	nt*	Fungicida	Fungistático	Fungistático
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TME12	R	R	nt*	nt*	nt*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TME33	nt*	nt*	Fungicida	R	R
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TME35	nt*	nt*	Fungicida	R	R
<i>Trichophyton rubrum</i> TRU31	Fungicida	Fungicida	R	R	R
<i>Microsporium gypseum</i> MGY48	R	R	nt*	nt*	nt*
<i>Microsporium canis</i> MCA29	R	R	nt*	nt*	nt*
<i>Microsporium canis</i> MCA36	nt*	nt*	R	R	Fungistático
<i>Microsporium canis</i> MCA01	nt*	nt*	Fungicida	Fungicida	Fungicida
<i>Scytalidium dimidiatum</i> SYD08	Fungicida	Fungicida	Nt	Nt	Nt

R = resistente (> 500 µg.mL⁻¹); FC = Fungicida; FT = Fungistático; nt = não testado; nt* = não testado em virtude da inviabilidade do isolado no momento do ensaio. SME/11 = *S. megapotamicum* coleta de 2011; SME/12 = *S. megapotamicum* (coleta em 2012); SRI/FI = *S. riedelli* (Folhas coletadas no período de inflorescência); SRI/F = *S. riedelli* (Folhas).

O *screening* contra fungos filamentosos realizado para as amostras SME/12, SRI/FI e SRI/F também apresentou atividade fungistática e fungicida para grande parte das espécies de dermatófitos testadas, na concentração de 500 µg/mL (Tabela 6). Especificamente, SME/12 exibiu atividade semelhante a amostra da mesma

espécie (SME/11) coletada em período diferente, inibindo todos os fungos testados, exceto *T. rubrum* e um isolado de *M. canis* que demonstraram resistência. É importante considerar, que as atividades biológicas estão relacionadas à composição química do óleo volátil e, como discutido anteriormente ocorreram variações entre os constituintes desta espécie nas amostras coletadas em diferentes períodos.

Considerando a quantidade da amostra obtida e a finalidade de comparar os resultados biológicos do óleo puro com o óleo nanoemulsionado, os ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram conduzidos apenas para a amostra SME/11, timol e para a nanoemulsão. Os resultados desse ensaio estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo volátil de *Stenachaenium megapotamicum* (SME/11), nanoemulsão e timol contra dermatófitos.

Microorganismo	Terbinafina	Timol		Óleo volátil		Nanoemulsão	
	CIM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Epidermophyton floccosum</i>							
EPF 07	0,25	166,25	>166,25	83,25	166,25	5,18	20,75
EPF 31	0,5	83,25	>166,25	83,25	>166,25	10,37	10,37
EPF 01	0,25	41,62	>166,25	>166,25	>166,25	5,18	10,37
EPF W4	0,25	166,25	>166,25	83,25	>166,25	10,37	20,75
EPF 18	1	>166,25	>166,25	83,25	166,25	nt	nt
<i>Trichophyton rubrum</i>							
TRU 06	-	166,25	>166,25	166,25	>166,25	41,5	41,5
TRU 25	-	83,25	166,25	41,62	166,25	5,18	5,18
TRU 04	0,25	>166,25	>166,25	166,25	>166,25	20,75	41,5
TRU 09	0,5	166,25	>166,25	83,25	166,25	41,5	41,5
TRU 31	0,25	166,25	>166,25	41,62	83,25	nt	nt
TRU 23	1	83,25	>166,25	20,81	41,62	nt	nt
TRU 13	0,25	>166,25	>166,25	166,25	>166,25	nt	nt
<i>Scytalidium dimiatum</i>							
SYD 07	0,25	R	R	166,25	>166,25	R	R
SYD 08	0,25	>166,25	>166,25	166,25	>166,25	166	R
SYD 04	0,25	R	R	166,25	>166,25	166	166
SYD 09	0,25	>166,25	>166,25	166,25	>166,25	nt	nt
SYD 05	0,25	166,25	>166,25	166,25	>166,25	nt	NT

nt = não testado; R = resistente (>500µg.mL⁻¹). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e as CIMs e CFMs são apresentadas como média dos valores (µg mL⁻¹).

Isolados de *E. floccosum* e *T. rubrum* exibiram maior susceptibilidade para SME/11, com valores de CIM na faixa de 20,81 a 166,25 µg/mL e CFM de 166 µg/mL para os três dermatófitos testados. Esses resultados indicam que o óleo demonstrou seletividade e alta atividade antifúngica contra dermatófitos, considerando que a literatura determina como potencialmente ativas substâncias que apresentam valores de CIM até 250 µg/mL (ALIGIANNIS et al., 2001).

A atividade seletiva exibida, caracterizada como antidermatofítica, tem sido descrita na literatura para muitos compostos derivados de plantas (ZOHRI; ABDEL-GAWADL; SABER; 1995; PRASAD et al., 2004; KUIATE et al., 2006; BAJPAI et al., 2009; SAVIUC et al., 2011). Para óleos voláteis de outras espécies, esta atividade também tem sido reportada, entretanto com algumas variações nos valores de CIM. O óleo volátil das folhas e inflorescências de *Solidago chilensis* apresentou-se como eficiente agente antifúngico contra dermatófitos das espécies *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* e inativo contra isolados de *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium purpurogenum*, pelo método disco-difusão em ágar, com adição de 5 e 10 µL de óleo nos discos. Não houve determinação da relação dos constituintes do óleo com a atividade, mas os autores relataram que a composição química era em maior parte composta por sesquiterpenos hidrocarbonados (VILA et al., 2002). Bajpai e colaboradores (2009) descreveram potencial atividade antidermatofítica para o óleo de *Metasequoia glyptostroboides* contra *T. mentagrophytes* e *M. canis* com valor de CIM menor do que observado neste estudo (62,5 µg/ml).

Óleos voláteis de outras espécies da família Asteraceae são descritos apresentando forte atividade antifúngica, entretanto não seletiva a dermatofitos, mas capaz de inibir o crescimento de diferentes espécies de microrganismos. A avaliação do óleo obtido das raízes de *Bidens tripartita* apresentou moderada atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas e alta atividade fungistática contra fungos leveduriformes (TOMCZYKOWA et al., 2011). O óleo de *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link, também avaliado pelo método de microdiluição em caldo, demonstrou maior sensibilidade aos isolados de dermatófitos das espécies *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *T. rubrum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, com valores de CIM muito baixos, na faixa de 0,16 a 0,32 µg/mL. Essa atividade não foi seletiva, considerando que o óleo inibiu o crescimento de espécies de *Candida* e *Aspergillus*, mesmo que de forma menos pronunciada (CABRAL et al., 2013). Atividade fungicida e fungistática contra dermatófitos dos gêneros *Microsporium* e *Trichophyton*, foi evidenciada para o óleo de *Matricaria recutita*, na concentração de 2,5 a 80 µg/ml, com inibição do crescimento de forma dose-dependente (JAMALIAN et al., 2012). Apesar dos importantes resultados, uma ação seletiva é sempre mais indicada, considerando

que pode evitar efeitos adversos sobre a microbiota normal do indivíduo, além da especificidade ao agente causal do processo infeccioso.

Além do óleo volátil, atividade antidermatofítica é relatada para outros compostos de origem vegetal obtidos a partir de extratos com solventes orgânicos (HOUGHTON et al., 2006; ALJABRE et al., 2005; KUSUMA et al., 2010; NAHAR et al., 2010; BALAKUMAR et al., 2011).

Atividade antifúngica é relatada para ambos, óleo total e compostos isolados (ABDELGALEIL et al., 2008; TOMCZYKOWA et al., 2011). A ocorrência de sinergismo entre os constituintes do óleo volátil contribui significativamente para este efeito. Em muitos casos, a atividade do óleo é maior, quando comparada aos efeitos de constituintes isolados, mesmo que majoritários (ROMAGNOLI et al., 2005; PAVELA et al., 2010). Por isso, timol, o principal constituinte na fração monoterpênica do óleo volátil de SME foi testado isoladamente com a finalidade de comparação com os resultados obtidos para o óleo total. Como esperado, este composto apresentou importante atividade contra os fungos testados, inclusive apresentando também seletividade aos dermatófitos. Entretanto, a CIM e CFM foram mais altas em comparação aos valores do óleo total, sugerindo a ocorrência de sinergismo.

O mesmo efeito foi observado para o óleo volátil de *Tagetes patula*. Nesse estudo, o óleo exibiu notável atividade antifúngica, apresentando 100% de inibição de crescimento dos microrganismos mesmo nas concentrações mais baixas, enquanto que os compostos majoritários isolados, piperitona e piperitenona, apresentaram essa atividade reduzida. Quanto ao mecanismo, através de microscopia eletrônica, os autores observaram que o óleo induziu alterações no sistema de endomembrana, sugerindo a membrana celular como um alvo importante, e que os terpenoides podem interferir em sua bicamada fosfolipídica. Ainda propõe que a presença de um composto alifático no óleo, como o linalol, por exemplo, e uma cetona, como a piperitona, potencializam o efeito antifúngico (ROMAGNOLI et al., 2005). Nesse sentido, a atividade não pode ser atribuída apenas a um componente isolado, mesmo que este esteja em abundância no óleo,

ao contrário, a atividade biológica depende do sinergismo das diferentes características químicas dos diversos compostos.

A alta quantidade de timol e carvacrol no óleo de *Thymus pulegioides*, 26% e 21%, respectivamente, foi associada à inibição do crescimento de isolados de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* (CIMs de 0,16 a 0,32 µg/mL), já que estes constituintes isoladamente apresentaram valores de concentrações inibitórias semelhantes aquelas observadas para o óleo (MICs de 0,04 a 0,32 µg/mL para carvacrol e 0,08 a 0,32 µg/mL para o timol). Esse estudo empregou ainda a citometria de fluxo para avaliar o efeito do óleo volátil na integridade da célula fúngica, e os resultados demonstraram que o óleo agiu lesando primeiramente a membrana. O ergosterol, principal constituinte da membrana de leveduras e responsável pelo monitoramento da função e integridade celular sofreu redução na concentração em cerca de 70%, quando *T. rubrum* foi submetido a uma concentração subinibitória (0,08 µg/mL). Desta forma, os autores concluíram que o óleo induziu consideravelmente a injúria na biossíntese de ergosterol tanto para *T. rubrum* quanto para *C. albicans* (PINTO et al., 2006).

Devido à hidrofobicidade dos óleos voláteis, membranas biológicas caracterizam seu principal sítio de ação, principalmente através de acúmulo do composto ativo, resultando em sua ruptura. Outros estudos também sugerem que constituintes de óleos voláteis atuam causando lesão na membrana fúngica, além de reduzir de forma importante o conteúdo de ergosterol (KHAN et al., 2010). São fortes os indícios e muitos relatos de que compostos fenólicos estejam relacionados com a atividade antifúngica, incluindo hidroxilas fenólicas presentes em monoterpenos, como, por exemplo, carvacrol e timol (KURDELAS et al., 2012). Similarmente, Liolios e colaboradores (2009) sugerem que a atividade antimicrobiana pode ser atribuída a monoterpenos, que devido ao seu caráter lipofílico atuam aumentando a permeabilidade da membrana.

A literatura relata que timol e derivados de cumarina, alguns dos compostos presentes em quantidades importantes no óleo volátil da espécie SME, possuem importante atividade antifúngica (BOUCHRA et al., 2003, BRAGA et al., 2008). Stein e colaboradores (2006) relataram que cumarinas isoladas de espécies de

Pterocaulon não apresentaram atividade antifúngica em concentrações menores que 250 µg/mL, mas que a combinação de duas cumarinas isoladas exibiram atividade significativa contra *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* com valores aproximados de CIM de 31, 62 e 31 µg/mL, respectivamente. Em outro estudo, timol exibiu significativa atividade antifúngica, apresentando CIM de 62,5 µg/mL contra isolados de algumas espécies de dermatófitos (KURDELAS et al., 2012).

Com relação à nanoemulsão observou-se importante aumento na inibição do crescimento fúngico em comparação com o óleo volátil livre. O óleo nanoemulsionado exibiu valores de CFM na faixa de 10,37 a 20,75 µg/mL e 5,18 a 41,50 µg/mL, e valores de CIM de 5,18 a 10,37 µg/mL e 20,75 µg/mL para *E. floccosum* e *T. rubrum*, respectivamente (Tabela 7). Esses resultados demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) na sensibilidade dessas duas espécies quando comparadas aos valores de CIM e CFM observados para o óleo volátil livre. Similarmente ao óleo, os valores das concentrações inibitórias do timol foram significativamente diminuídos em relação à nanoemulsão ($p < 0,05$), incluindo isolados de *S. dimidiatum*, nesse caso devido aos altos valores da CIM e CFM para esta espécie fúngica. É importante ressaltar que a nanoemulsão desenvolvida como controle, excluindo-se o óleo volátil, não foi capaz de inibir o crescimento fúngico.

Alguns estudos evidenciaram melhora no efeito das substâncias envolvidas em sistemas nanoparticulados devido ao reduzido tamanho da partícula (CHIFIRIUC et al., 2012; SAKULKU et al., 2012). De acordo com Donsì e colaboradores (2010), a redução no tamanho de partícula para menor que 200 nm ativa mecanismos de transporte passivo através da membrana da célula, justificando a potencialização na atividade do óleo contido no sistema nanoparticulado.

Similarmente, outros estudos com tentativas de desenvolvimento de nanopartículas capazes de carrear óleos voláteis têm sido realizados (KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013). Uma nanoemulsão contendo citronela controlou a liberação, assim como melhorou a atividade repelente do óleo avaliado *in vivo*, além de contribuir para sua estabilidade durante a estocagem (SAKULKU et al., 2012). Em outro estudo, um sistema nanoparticulado protegeu o óleo volátil contra evaporação, e ainda diminuiu o odor pronunciado e

aumentou sua estabilidade (FLORES et al., 2011). Nuchuchua e colaboradores (2009) melhoraram a integridade de óleos voláteis, aumentando a vaporização e conseqüentemente prolongando sua atividade repelente, previamente descrita para o óleo da espécie testada. Similarmente, a nanoencapsulação de compostos isolados de óleos voláteis, como timol e carvacrol, potencializou a atividade biológica pré-estabelecida (CHEN et al., 2009; WU; LUO; WANG, 2012).

Apesar do sistema nanoparticulado não aumentar a sensibilidade dos isolados de *S. dimidiatum*, os resultados obtidos de SME/11 para isolados desta espécie (valores de 166,25 e >166,25 µg/mL para CIM e CFM, respectivamente), bem como para o restante das cepas, são considerados como potente atividade antifúngica, em virtude de que a literatura considera como altamente ativas, substâncias que exibem valores de CIM menores que 250 µg/mL (ALIGIANNIS et al., 2001). *Scytalidium dimidiatum* é um fungo não-dermatófito, também conhecido como falso-dermatófito, mas capaz de causar dermatomicoses, cujas manifestações clínicas assemelham-se a infecções pelo gênero *Trichophyton*. Atualmente o tratamento dérmico não é efetivo para infecções cutâneas provocadas por este fungo. Em geral o tratamento usual utiliza antifúngicos tópicos por muitos meses, levando a baixa adesão ao protocolo prescrito, associado à dificuldade de acesso aos locais de infecção pelo próprio agente antimicrobiano (HAY, 2002; DUNAND; PAUGAM, 2008), denotando grande importância a substâncias ativas contra este microrganismo, como o óleo volátil de *S. megapotamicum*.

4.6 Atividade antiquimiotática

Durante um processo inflamatório ocorrem alterações hemodinâmicas e na permeabilidade dos vasos sanguíneos, e agregação de células inflamatórias. Esse acúmulo de células provém da migração leucocitária direcionada ao foco do processo inflamatório, chamada de quimiotaxia (MONKS et al., 2002). Os leucócitos, nesse caso, são neutrófilos polimorfonucleares especializados na defesa do organismo contra fungos, bactérias, vírus ou outros patógenos, e são rapidamente ativados após a exposição, migrando da corrente sanguínea ao foco da lesão (ZEN et al., 2006). Por esse motivo, os óleos voláteis foram submetidos ao ensaio

antiquimiotáxico, a fim de avaliar sua capacidade de inibição da migração leucocitária.

Os ensaios de avaliação da migração celular *in vitro*, como o método aplicado, são comumente utilizados para avaliar supostos mecanismos de atividade anti-inflamatória de produtos de origem vegetal ou farmacológicos, possibilitando a avaliação de diversas concentrações e, a manipulação de elevadas quantidades de célula, o que aumenta a confiabilidade do estudo (ENTSCHLADEN et al., 2005).

Dessa forma, estimou-se no ensaio, o potencial das amostras em inibir a migração de neutrófilos polimorfonucleares através de um filtro pelo método da câmara de Boyden. As amostras dos óleos voláteis foram testadas nas concentrações de 0,5 a 5 µg/mL, exceto para SME/12, SAD e SMA, testadas apenas nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL, em virtude da quantidade reduzida de óleo. Os resultados obtidos com o teste estão demonstrados na Tabela 8 e expressos em percentual máximo de quimiotaxia em relação ao grupo controle (LPS). Indometacina foi utilizada como controle positivo, apresentando 55% de inibição da migração dos leucócitos na concentração de 10 µg/mL.

Nas concentrações de 1 a 5 µg/mL, todas as amostras de óleo volátil testadas exibiram significativa inibição da migração leucocitária em relação ao LPS ($p < 0,05$), exceto SAD, que não demonstrou atividade em nenhuma das concentrações avaliadas (2,5 e 5 µg/mL). Para aquelas que apresentaram efeito significativo, a inibição variou de 27 a 100%, sendo 1 µg/mL a concentração mais baixa que exibiu inibição significativa.

As amostras de SRI apresentaram maior perfil antiquimiotáxico em relação as demais, sendo que SRI/FI exibiu 100% de inibição da migração na concentração de 5 µg/mL. A mesma concentração para as amostras de folhas (SRI/F) e inflorescências (SRI/I) inibiu a migração dos leucócitos em torno de 90%.

Tabela 7. Efeito do óleo volátil das diferentes espécies de *Stenachaenium* e da nanoemulsão de *S. megapotamicum* na quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares *in vitro* em relação ao LPS.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Migração (µm)	Inibição da Migração (%)
SMA	5	52,6 ± 1,9*	33,7*
	2,5	57,7 ± 3,4*	27,1*
SME/11	5	27,2 ± 1,7*	65,7*
	2,5	39,8 ± 1,8*	49,7*
	1,25	41,5 ± 2,5*	47,8*
	1	45,6 ± 2,0*	42,5*
	0,5	72,3 ± 5,4	8,73
SME/12	5	30,1 ± 2,4*	62,0*
	2,5	52,5 ± 3,8*	33,7*
SRI/I	5	5,4 ± 0,8*	93,15*
	2,5	26,2 ± 1,7*	67,0*
	1	50,6 ± 3,1*	36,2*
	0,5	59,6 ± 3,5*	24,8*
SRI/F	5	9,7 ± 1,01*	87,8*
	2,5	7,8 ± 0,7*	90,2*
	1	37,4 ± 2,9*	52,8*
	0,5	39,1 ± 3,1*	50,7*
SRI/FI	5	0,0 ± 0,0*	100*
	2,5	3,0 ± 0,4*	96,21*
	1	43,1 ± 1,8*	45,6*
	0,5	66,5 ± 1,7	16,0
Nanoemulsão B	5	24,7 ± 2,4*	68,8*
	2,5	33,0 ± 2,8*	58,4*
	1,25	29,1 ± 1,4*	63,3*
	1	36,5 ± 2,8*	53,9*
Nanoemulsão Controle	5	43,8 ± 3,0*	44,7*
	2,5	46,7 ± 6,4*	41,1*
	1,25	49,1 ± 2,8*	38,0*
	1	46,0 ± 2,3*	42,0*
Controle Positivo (LPS)	-	79,2 ± 6,4	0

A quimiotaxia é representada como média ± EMP da migração de leucócitos. * p < 0,05 indica uma diferença significativa comparada ao LPS (ANOVA seguida pelo teste de Tukey). LPS (Lipopolissacarídeo de *Scherichia coli*). SME/11 (*S. megapotamicum* - coleta de 2011); SMA/12 (*S. megapotamicum* - coleta de 2012); SRI/I (*S. riedelli* - Inflorescência); SRI/F (*S. riedelli* - Folhas); SRI/FI (*S. riedelli* - Folhas coletadas durante o período da inflorescência); SMA (*S. macrocephalum*).

Os óleos voláteis da espécie SME apresentaram perfil semelhante de inibição entre eles, entretanto, a concentração mais alta (5 µg/mL) foi capaz de inibir apenas 65,7% e 62% da migração leucocitária, respectivamente para SME/11 e SME/12.

Em relação a SMA, as concentrações testadas apresentaram atividade, entretanto em baixa potência, inibindo apenas 33,7% e 27,1% da migração leucocitária para 5 e 2,5 µg/mL, respectivamente.

As diferenças na atividade estão relacionadas à variabilidade na composição química das amostras. Como já discutido, o perfil químico dos diferentes óleos voláteis da espécie SRI exibiu predominância de compostos alifáticos e uma fração reduzida de terpenos. O contrário foi observado para as amostras da espécie SME, onde prevaleceu a fração terpênica, composta principalmente de sesquiterpenos oxigenados.

Os neutrófilos são células com importante papel na defesa do hospedeiro e colaboram de forma primária em processos inflamatórios agudos através de diversos mecanismos, como liberação de fatores quimiotáticos. Além da migração leucocitária, na resposta inflamatória há liberação de citocinas, como interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF), e ativação de atividades enzimáticas (MIGUEL, 2010). Dessa forma, a inibição do processo de migração dos leucócitos pode estar relacionada a algum mecanismo de controle da resposta inflamatória (RIOJA et al., 2000; BARROS et al., 2013). Considerando que os neutrófilos estão presentes na fase aguda desse processo, os resultados obtidos sugerem que os óleos voláteis das diferentes espécies de *Stenachaenium* atuem nessa fase da inflamação, inibindo sua migração até o foco do quadro inflamatório.

Segundo Miguel (2010), a atividade anti-inflamatória dos óleos voláteis pode estar relacionada à cascata de sinalização que envolve citocinas e fatores de transcrição. Diversos estudos demonstraram atividade anti-inflamatória provenientes de óleos voláteis obtidos de espécies de diferentes famílias botânicas, entretanto, grande parte empregou outros métodos de avaliação da migração leucocitária, principalmente indução do processo inflamatório por carragenina ou pela determinação da influência dos óleos voláteis na liberação de marcadores inflamatórios (MARTINS et al., 2008; TSAI et al., 2010; ZAKARIA et al., 2011). Assim, frações do óleo volátil obtidas do *Origanum vulgare* exerceram essa atividade através da inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, e ainda, potencializaram a secreção da citocina IL-10, uma interleucina anti-

inflamatória capaz de inibir a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (FUENTES et al., 2010). Entretanto, o óleo volátil de *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link apresentou benefícios ao processo anti-inflamatório, através da redução da produção de NO estimulada por LPS em macrófagos (CABRAL et al., 2013). O estudo com óleo volátil proveniente das raízes de *Carlina acanthifolia* exibiu o efeito anti-inflamatório inibindo a síntese de ciclo-oxigenases e a migração dos leucócitos ao foco do processo inflamatório, associado a sua atividade sequestradora de radicais livres (ĐORĐEVIĆ et al., 2007).

Alguns compostos isolados de óleos voláteis também foram descritos exibindo atividades relacionadas à inibição de processos inflamatórios por diversos mecanismos, como timol, carvacrol, *trans*-cinamaldeído, mirceno, limoneno, α -humuleno, *trans*-cariofileno, citral, 1,8-cineol, canfeno, borneol, entre outros (MEDEIROS et al., 2007; LIN et al., 2008; TAKAKI et al., 2008; BALLABENI et al., 2010; MULYANINGSIH et al., 2010; TAVARES et al., 2010; TUMEN et al., 2011). O pré-tratamento com o óleo volátil de *Lippia gracilis*, em um modelo experimental de indução de edema de pata de rato, apresentou potencial atividade anti-inflamatória, reduzindo o volume de exsudato e inibindo a migração leucocitária ao foco da lesão em 25%. Os autores relacionam esse efeito ao alto conteúdo de carvacrol, monoterpeno majoritário no óleo volátil avaliado (44,43%) (GUILHON et al., 2011). A potencial atividade anti-inflamatória do óleo volátil de *Cinnamomum osmophloeum* foi estabelecida pela importante redução da secreção de TNF e IL-1 β em células estimuladas por LPS. Nesse caso, os autores sugerem que os principais constituintes do óleo, 1,8-cineol, espatulenol e óxido de cariofileno podem ter importante papel na regulação da resposta imune mediada por células (CHAO et al., 2005). Já o pronunciado perfil anti-inflamatório exercido pelo óleo volátil das folhas de *Cordia verbenacea* D.C. foi relacionado à presença dos sesquiterpenos humuleno e *trans*-cariofileno. Essa hipótese deriva dos dados que demonstraram que ambos os compostos são altamente eficazes na redução do edema de pata induzido por carragenina (PASSOS et al., 2007). O estudo de Esteves e colaboradores (2005) sugere que esta atividade proveniente do óleo das folhas de *Casearia sylvestris* está relacionada aos compostos terpênicos. Nesse caso, biciclogermacreno foi o composto majoritário (40,9%), seguido de β -acoradieno (20,8%) e cariofileno (13,8%), enquanto que timol (32,7%) é um dos constituintes do óleo volátil de

Heracleum persicum considerado como um dos principais responsáveis pela inibição de mediadores inflamatórios e da migração de leucócitos induzida por carragenina, observada nesse estudo. Entretanto os autores ainda consideram a possibilidade de efeito sinérgico com os constituintes minoritários (MENDES et al., 2010).

Segundo os autores, a atividade anti-inflamatória, causada pela redução na produção local de mediadores inflamatórios, do óleo volátil das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit pode ser explicada pela grande quantidade de sesquiterpenos presentes no óleo, onde β -cariofileno e óxido de cariofileno, representavam aproximadamente 78% da composição química total (RAYMUNDO et al., 2011).

A importância de substâncias que apresentem propriedades antifúngicas, assim como anti-inflamatórias, está relacionada ao fato de que um processo inflamatório traz inúmeros benefícios à cura da infecção, entretanto, quando a resposta torna-se exagerada não associa-se a maior proteção, mas ao aumento da susceptibilidade à infecção fúngica (ROMANI, 2011; COTTIER; PAVELKA, 2012).

Com relação à nanoemulsão contendo o óleo volátil de SME/11 todas as concentrações testadas (1 a 5 $\mu\text{g/mL}$) inibiram significativamente a migração leucocitária em relação ao LPS ($p < 0,05$), na faixa de 53,9 à 68,8%. Entretanto, comparativamente ao óleo puro, não houve diferença significativa na atividade, ou seja, nesse ensaio, o sistema nanoparticulado não apresentou potencialização no efeito do óleo livre.

Como descrito, para óleos voláteis, busca-se um sistema nanoparticulado capaz de propiciar a proteção da substância ativa e melhorar a atividade biológica já estabelecida. Entretanto, a potencialização da atividade está intimamente relacionada ao tipo de ensaio, efeito esperado e mecanismo avaliado. Para o ensaio de atividade antifúngica, o tamanho reduzido das nanopartículas facilitando a penetração do ativo através da membrana fúngica é a principal hipótese da potencialização do efeito do óleo volátil. Entretanto, no ensaio de antiqumiotaxia, o sistema não trouxe benefícios com relação à inibição da migração celular comparado ao óleo livre. Como referido nos estudos acima, grande parte das hipóteses em relação ao mecanismo de ação dos óleos voláteis associados a

processos inflamatórios, recai sobre a redução da produção de fatores mediadores e conseqüentemente a inibição da migração leucocitária. É provável que para o mecanismo avaliado nesse ensaio, a nanoemulsão não apresente possibilidades de potencialização de efeito.

Entretanto, outro fator a ser considerado, refere-se à inibição da migração leucocitária pela nanoemulsão, que não continha o óleo volátil, considerada como nanoemulsão controle. Essa formulação também apresentou valores de inibição significativamente diferentes do controle (LPS) ($p < 0,05$), como pode ser visualizado na Tabela 8. Contudo, esse efeito foi significativamente menor, em relação à atividade do óleo volátil puro e da nanoemulsão que continha o óleo de SME/11. O estudo de Kùlkamp e colaboradores (2011) revelou efeito semelhante para ensaio de peroxidação lipídica a partir de nanocápsulas usadas como controle, livres de ácido lipóico, substância ativa utilizada no estudo, onde apresentaram significativa atividade antioxidante comparada com o controle. Segundo os autores, a organização estrutural dos componentes da formulação em nanocápsulas pode contribuir para atividade antioxidante, além da eventual presença de átomos de carbonos insaturados, bem como impurezas da matéria-prima utilizada na formulação.

4.7 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio, como íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxila (OH^\bullet) são altamente reativas e podem gerar processos patológicos quando sua produção está em desequilíbrio com o sistema antioxidante do organismo (SINGH et al., 2009). A formação desses radicais está diretamente envolvida em processos tanto inflamatórios quanto infecciosos (JIA et al., 2010) e a atividade antioxidante pode ocorrer por diversos mecanismos. Por essa razão os óleos voláteis obtidos foram submetidos a ensaios de avaliação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH e TBARS, técnicas comumente utilizadas para essa finalidade, entretanto com princípios distintos.

No caso do ensaio de DPPH, quando a substância é antioxidante, atua basicamente doando um átomo de hidrogênio formando um radical mais estável (MIGUEL, 2010). Desta forma, capacidade de redução da formação de radicais é determinada pela diminuição da absorção induzida pelo antioxidante (SARIKURKCU et al., 2010).

Assim, a atividade sequestradora de radicais livres determinada por esta técnica foi empregada para a avaliação dos óleos voláteis de SRI/F, SRI/FI, SRI/F, SAD, SME/11 e SME/12 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Entretanto, nenhuma das amostras apresentou efeito antioxidante por este método nas concentrações avaliadas, apenas o controle positivo exibiu a atividade antioxidante esperada, e por esta razão, não avaliou-se tal atividade para nanoemulsão por essa técnica.

A atividade antioxidante pode ocorrer por diferentes mecanismos, como prevenção da decomposição de peróxidos, sequestro de radicais livres, redução da capacidade de ligação de íons a metais de transição, inibição da peroxidação lipídica, entre outros (ZENG et al., 2011b). Devido a sua estrutura química insaturada e presença marcante nas células, os lipídios são alvos fáceis de oxidação. Em muitos casos, o processo de peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica presente na membrana celular. O ensaio de TBARS avalia basicamente a formação de produtos originários desse processo, explorando a habilidade de uma substância em inibir a peroxidação de um substrato (KÜLKAMP et al., 2011).

Esse método baseia-se na mensuração do malondialdeído originado da decomposição de hidroperóxidos de lipídios, e que pela reação com ácido tiobarbitúrico, em meio ácido, forma um complexo de cor rósea, que absorve em 532 nm (MIGUEL, 2010). Dessa forma, avaliou-se a capacidade de inibição da peroxidação lipídica de SRI/I, SRI/FI, SRI/F, SME/11, SME/12 e da nanoemulsão contendo o óleo volátil de SME/11, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL (Tabela 9).

Todas as amostras de óleo volátil nas concentrações testadas (exceto SME/12 na concentração de 10 µg/mL) inibiram significativamente a peroxidação lipídica em relação ao controle ($p < 0,05$), contudo em escalas variadas. O maior percentual de inibição, em todos os casos, está relacionado a mais alta concentração testada (100 µg/mL).

Tabela 8. Inibição da peroxidação lipídica das amostras de óleo volátil das diferentes espécies de *Stenachaenium* Benth., através do método de TBARS.

Amostra	Concentração (µg/mL)	% de Oxidação	% de Inibição da peroxidação lipídica
SME/11	100	46,7*	53,3
	50	63,9*	36,1
	10	75,5*	24,5
SME/12	100	42,2*	57,8
	50	49,9*	50,6
	10	97,6	2,4
SRI/I	100	26,7*	73,3
	50	48,3*	51,7
	10	82,8*	17,2
SRI/FI	100	32,8*	67,2
	50	42,9*	57,1
	10	77,0*	23,0
SRI/F	100	68,8*	31,2
	50	72,8*	27,2
	10	86,0*	14,0
Nanoemulsão B	100	60,7*	39,3
	50	65,7*	34,3
	10	72,9*	27,1

* $p < 0,05$ indica uma diferença significativa em relação ao controle (ANOVA seguida pelo teste de Tukey). SRI/I (*S. riedelli* – Inflorescência); SRI/F (*S. riedelli* – Folhas); SRI/FI (*S. riedelli* – Folhas coletadas durante o período da inflorescência); SME/11 (*S. megapotamicum* - coleta de 2011) e SMA/12 (*S. megapotamicum* – coleta de 2012).

SRI/I apresentou o maior perfil de inibição, com 73,3% para a concentração de 100 µg/mL. A amostra SRI/FI exibiu resultados semelhantes (67,2%), enquanto que para SRI/F o percentual de inibição da peroxidação lipídica reduziu para 31%, mesmo na concentração de 100 µg/mL.

Em relação a espécie SME, ambas as amostras (SME/11 e SME/12) demonstraram cerca de 50% de inibição para a concentração de 100 µg/mL, contudo, diferiram de forma importante na concentração mais baixa (10 µg/mL), onde SME/11 apresentou 24,5% de inibição, enquanto que SME/12, apenas 2,4%, não sendo, por isso, considerada significativamente diferente do controle.

Diferentes espécies botânicas, avaliadas pelo método de TBARS, também demonstraram atividade antioxidante para o óleo volátil (SINGH et al., 2008;

BERETTA et al., 2011). Semelhante aos resultados observados com SMA/FI, o estudo com óleo volátil proveniente das raízes de *Carlina acanthifolia* exibiu inibição da peroxidação lipídica com efeito máximo de 65,89%, entretanto em uma concentração muito inferior (2,5 µg/mL) (ĐORĐEVIĆ et al., 2007), enquanto que os óleos voláteis obtidos de *Thymus vulgaris*, *Nigella sativa* e *Lavandula officinalis* exibiram efeito mais pronunciado, com inibição de 80,76%, 70,35% e 52,52%, respectivamente, para concentração de 50 mg/mL (VIUDA-MARTOS et al., 2011).

Para o óleo volátil de *Gnaphlium affine*, as concentrações na faixa de 0,625 a 5 µg/mL apresentaram inibição da peroxidação lipídica de 61,32% a 71,25%. Para os autores, essa atividade está relacionada a compostos como linalol, eugenol, *trans*-cariofileno, α -terpineol e *p*-cimeno, presentes no óleo, considerando que estes compostos são caracterizados como biologicamente ativos, doando íons de hidrogênio para radicais livres e dessa forma, interrompendo o processo de peroxidação lipídica (ZENG et al., 2011b). Segundo Jia e colaboradores (2010), *p*-cimeno, além de timol e γ -terpineno, desempenhou um importante papel na atividade antioxidante dos óleos voláteis de *Thymus marschallianus* Will. e *Thymus proximus* Serg. avaliados pelo TBARS.

Para a atividade antioxidante do óleo de *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan., observou-se esse efeito, considerando que os compostos majoritários testados isoladamente não exibiram atividade, enquanto que o óleo volátil demonstrou-se como potencial agente antioxidante (CANDAN et al., 2003). A avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* L. e do padrão de alguns de seus principais constituintes (borneol, linalol, cineol, terpinen-4-ol, carvacrol, timol e verbenona), realizada por Beretta e colaboradores (2011), exibiu efeito reduzido dos compostos isolados na inibição da peroxidação lipídica quando comparado ao óleo total, demonstrando sinergismo. Assim, a atividade antioxidante dos óleos voláteis pode estar relacionada a compostos fenólicos ou terpenos isoladamente, ou ainda à associação dessas substâncias (VIUDA-MARTOS et al., 2011).

Fatores relacionados diretamente à obtenção do óleo volátil, como a diferença na composição química, podem ser responsáveis pela variabilidade na atividade

biológica. Bounatirou e colaboradores (2007) demonstraram que o óleo de *Thymus capitatus*, obtido em diferentes fases de desenvolvimento do vegetal apresentou perfil antioxidante diferenciado, com faixa de inibição da peroxidação lipídica de 28% a 88%, em concentrações de 100 a 1000 mg/L, sendo que os resultados mais significativos foram visualizados na fase pós-floração. Essa diferença é explicada pelos autores pela diversidade das quantidades relativas dos compostos presentes no óleo.

Tanto o óleo volátil da espécie *S. megapotamicum* quanto *S. riedelli* apresentaram importante atividade antifúngica contra fungos dermatófitos, enquanto que a segunda apresentou potencial atividade anti-quimiotática, chegando a inibir 100% da migração leucocitária na concentração mais alta. O mesmo ocorreu no ensaio do TBARS, para avaliação da atividade antioxidante, onde *S. riedelli* apresentou maior percentual de inibição da peroxidação lipídica, no caso das amostras de inflorescência e de folhas com inflorescência e *S. megapotamicum* exibiu atividade antioxidante moderada. A associação de efeito antioxidante e anti-inflamatório pode potencializar a atividade antifúngica, considerando que o primeiro quadro de um processo infeccioso é caracterizado por inflamação e geração de radicais livres.

Similarmente às amostras de óleo volátil, a nanoemulsão apresentou resultados significativos em relação ao controle responsável pela peroxidação lipídica ($p < 0,05$), entretanto, assim como no ensaio de anti-quimiotaxia, não foi capaz de potencializar o efeito do óleo volátil livre. Para as concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, o óleo nanoemulsionado não exibiu diferença significativa de efeito comparado ao óleo livre em iguais concentrações, contudo, para 100 $\mu\text{g/mL}$, observou-se atividade antioxidante significativamente menor da nanoemulsão ($p < 0,05$) em relação ao óleo livre, apresentando 39,3% e 53,3% de inibição da peroxidação lipídica, respectivamente. A nanoemulsão controle, desenvolvida excluindo-se o óleo volátil, não apresentou inibição sobre a peroxidação lipídica. Como discutido, um sistema nanoparticulado, semelhante à nanoemulsão desenvolvida com o óleo de SME, pode melhorar a atividade da substância ativa, entretanto isso não ocorreu nesse ensaio.

A potencialização da atividade antioxidante determinada pelo método de TBARS utilizando nanopartículas foi descrita por Kùlkamp e colaboradores (2011). Nesse estudo, um sistema de nanocápsulas preparadas por deposição interfacial do polímero poli (ϵ -caprolactona), aumentou significativamente a atividade antioxidante do ácido lipóico. Entretanto, é importante considerar que as características da formulação utilizada são, em grande parte, distintas das nanoemulsões desenvolvidas.

Apesar de não ter potencializado o efeito do óleo volátil livre em todos os ensaios realizados nesse estudo, a nanoemulsão desenvolvida melhorou de forma significativa a atividade antifúngica do óleo volátil de SME, já considerado altamente potente. Outras pesquisas têm evidenciado melhora nas atividades biológicas provenientes de óleos voláteis através da inclusão de sistemas nanoparticulados. A avaliação de diferentes formulações de nanopartículas de quitosana e goma de angico contendo óleo volátil de *Lippia sidoides*, com diferentes razões de polímero, mostrou que o aumento da mortalidade larval foi proporcional a liberação da substância ativa, o óleo volátil (PAULA et al., 2010). O desenvolvimento de nanopartículas de polietilenoglicol contendo óleo volátil de *Allium sativum* L., manteve o controle da eficácia de inseticida contra *Tribolium castaneum* em mais de 80% depois de 5 meses, provavelmente devido a liberação lenta e contínua das substâncias ativas das partículas, em comparação com o óleo do alho livre (11% no mesmo período), melhorando o controle de pragas no armazenamento. Nesse caso ainda, o sistema nanoparticulado traria vantagens na diminuição da volatilidade, mascaramento do forte odor e melhora na solubilidade em água (YANG et al., 2009).

Uma combinação de quitosana, eugenol e carvacrol em nanopartículas objetivou melhorar as propriedades antibacterianas e antioxidantes desses compostos e ainda, diminuir sua toxicidade às células de mamíferos. Os resultados evidenciaram que a eficácia antibacteriana das nanopartículas com os componentes do óleo foi tão alta quanto ou ainda maior, quando comparada as nanopartículas com quitosana não modificada, além de diminuir sua toxicidade (CHEN et al., 2009). Em nanoemulsões de tamanhos diferentes de partícula (150 - 160 e 195 - 220 nm), contendo óleo volátil de citronela, manjeriçã e vetiver, testadas como repelente contra *Aedes aegypti*, observou-se que o tamanho de partícula influencia na

liberação do óleo, e relatou-se que a nanoemulsão com menor tamanho de partícula mostrou melhor estabilidade física, maior taxa de liberação dos componentes e também maior atividade repelente, possivelmente devido à maior integridade da fina película sobre a pele humana (NUCHUCHUA et al., 2009).

Independentemente da potencialização da atividade pelo sistema nanoparticulado, os óleos voláteis obtidos das diferentes espécies de *Stenachaenium* demonstraram-se potencialmente ativos contra fungos filamentosos, além de exibir importante capacidade antioxidante e antiquimiotóxica, principalmente nas amostras provenientes das espécies de SME e SRI.

Atualmente, é frequente a busca por compostos isolados de plantas como alternativa de tratamento para diversos processos patológicos. Substâncias com importantes perfis de atividade antifúngica estão entre os compostos mais investigados, considerando a crescente resistência de microrganismos aos agentes antifúngicos. Associado a esse perfil, compostos que apresentem atividade anti-inflamatória e antioxidante podem potencializar esse efeito. É descrito que embora o processo inflamatório seja necessário para o controle imediato de uma infecção, a resolução desse processo é de suma importância para manter o equilíbrio entre proteção e imunopatologia (ROMANI, 2011). Um processo inflamatório prolongado está associado ao desenvolvimento de infecções crônicas, como por exemplo, em casos de candidíase (ZELANTE et al., 2007; ROMANI, 2011). Relacionado ainda a esse processo, é sabido, que o estresse oxidativo, a partir da formação de radicais livres, ocorre em quadros de infecciosos e inflamatórios, gerando dano tecidual importante (MIGUEL, 2010; VIUDA-MARTOS et al., 2011).

Nesse sentido, os óleos voláteis avaliados podem ser considerados como substâncias com características promissoras para o tratamento de infecções causadas por dermatófitos, com o benefício de efeito antiquimiotóxico e antioxidante, e que o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados adaptados aos diferentes mecanismos relacionados a esse processo, podem potencializar essas atividades.

- A constituição química e a avaliação das atividades biológicas realizadas nesse trabalho constituem o primeiro relato científico relacionado aos óleos voláteis das espécies do gênero *Stenachaeniu* Benth: *S. adenanthum*, *S. macrocephalum*, *S. megapotamicum* e *S. riedelli*;
- A análise química dos óleos voláteis obtidos demonstrou importante variabilidade química entre os óleos das diferentes espécies, exibindo importante presença de sesquiterpenos para *S. adenanthum* e *S. megapotamicum*, e predominância de compostos alifáticos nas demais;
- O óleo volátil da espécie *S. megapotamicum* apresentou um derivado de cumarina, proposto como 2H-1-benzopiran-2-ona, 7-(3-metilbutoxi), em quantidades relevantes, e não obteve-se informações na literatura relacionando a presença desse composto em óleos voláteis;
- Os óleos voláteis de *S. megapotamicum* (coleta de 2012) e *S. riedelli* (amostras das folhas, tanto isoladas quanto coletadas em período de inflorescência) apresentaram atividade antifúngica contra fungos filamentosos, enquanto que *S. megapotamicum* (coleta de 2011), exibiu atividade antifúngica seletiva, considerada como antidermatofítica;
- Todas as amostras, exceto a espécie *S. adenanthum*, demonstraram inibição significativa da migração leucocitária em relação ao controle, avaliada no ensaio de antiquimiotaxia pelo método da câmara de Boyden;
- A atividade antioxidante avaliada pelo ensaio de TBARS demonstrou significativa inibição da peroxidação lipídica para as amostras das espécies *S. megapotamicum* e *S. riedelli*, chegando a 73% para o óleo volátil obtido de inflorescências da segunda espécie;
- Nas concentrações testadas (50 e 100 µg/mL) nenhuma das amostras apresentou atividade antioxidante pelo método de DPPH;

- O óleo volátil de *S. megapotamicum* (coleta de 2011) propiciou o desenvolvimento de uma nanoemulsão a partir da técnica de emulsificação espontânea, com características similares aquelas relatadas na literatura para o mesmo sistema;
- A nanoemulsão desenvolvida potencializou significativamente o efeito antifúngico demonstrado pelo óleo volátil de *S. megapotamicum*;
- Com relação à atividade antioxidante, o sistema nanoparticulado, avaliado pelo método de TBARS não foi efetivo na potencialização da inibição da peroxidação lipídica quando comparado ao óleo volátil livre.
- No ensaio de antiquimiotaxia, o óleo nanoemulsionado apresentou inibição da migração leucocitária de forma significativa em relação ao controle. Contudo, comparando-se o efeito do sistema nanoparticulado contendo o óleo ao óleo livre, não se observou diferença significativa, ou seja, da mesma forma que no ensaio de atividade antioxidante, a nanoemulsão não foi capaz de potencializar a atividade antiquimiotóxica do óleo volátil livre.

ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. H.; RASOUL, M. A. A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5947–5950, 2008.

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

AHMADI, F.; SADEGUI, S.; MODARRESI, M.; MIKAELI, A. Chemical composition, *in vitro* anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiglows* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1137-1144, 2010.

AHRONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 12, p.554-602, 2005.

AKROUT, A.; GONZALEZ, L. A.; EL JANI, H.; MADRID, P. C. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 342-347, 2011.

ALICE; C. B.; SIQUEIRA; N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. S; JOSÉ, K. F. D. **Plantas Mediciniais de Uso Popular: Atlas Farmacológico**. Canoas: Ed. da ULBRA, 1995.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALJABRE, S. H. M.; RANDHAWA, M. A.; AKHTAR, N.; ALAKLOBY, O. M.; ALQURASHI, A. M.; ALDOSSARY, A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 116–119, 2005.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 27, p. 780-788, 2008.

AL-QUDAH, M. A.; AL-JABER, H. I.; MAYYAS, A. S.; ABU-ORABI, S. T.; ZARGA, M. A. Chemical compositions of the essential oil from the Jordanian medicinal plant *Dittrichia viscosa*. **Jordan Journal of Chemistry**, v. 5, p. 343-348, 2010.

ANDRADE, J. M. M.; ABOY, A. L.; APEL, M. A.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; HENRIQUES, A. T. Phenolic composition in different genotypes of Guabiju fruits (*Myrcianthes pungens*) and their potential as antioxidant and antichemotactic agents. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. 1181-1187, 2011.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; RUSSO, M. T.; PIRISI, F. M.; SATTA, M.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp.

microphyllum (Willd) Nym. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1030-1034, 2003.

BAJPAI, V. K.; AL-REZA, S. M.; CHOI, U. K.; LEE, J. H.; KANG, S. C. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 47, 1876-1883, 2009.

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

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 309-312, 2011.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *in vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, p. 289–295, 2010.

BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-62, 2007.

BARROS, F. M. C.; PIPPI, B.; DRESCH, R. R.; DAUBER, B.; LUCIANO, S.C.; APEL, M. A.; FUENTEFRIA, A. M.; VON POSER, G. L. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 294-299, 2013.

BARROSO, G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, UFV/ Imprensa in Universitária 3, 1986.

BASILE, A.; SENATORE, F.; GARGANO, R.; SORBO, S.; DEL PEZZO, M. D.; LAVITOL, A.; RITIENI, A.; BRUNO, M.; SPATUZZI, D.; RIGANO, D.; VUOTTO, M. L. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 240-248, 2006.

BERETTA, G.; ARTALI, R.; FACINO, R. M.; GELMINI, F. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011. doi:10.1016/j.jpba.2011.03.026

BERETTA, M. E.; FERNANDES, A. C.; SCHNEIDER, A. A.; RITTER, M. R. Família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 189-216, 2008.

BLANC, M.; BRADESI, P.; GONÇALVES, M. J; SALGUEIRO, L.; CASANOVA, J. Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 21, p. 324-332, 2006.

BRAND, L.; EGGELING, C.; ZANDER, C.; DREXHAGE, K. H.; SEIDEL, C. A. M. Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: comparison of one- and two-photon excitation in solution. **Journal of Physical Chemistry**, v. 101, p. 4313-4321, 1997.

BLANK, A. F.; SANT'ANA, T. C. P.; SANTOS, P. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PRATA, A. P. N.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 831–837, 2011.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241–251, 2004.

BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; HASSANI, L. M.; HMAMOUCHEA, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 165–169, 2003.

BOHLMANN, J.; MARTIN, D.; OLDHAM, N. J.; GERSHENZON, J. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)- α -ocimene synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 375, n. 2, p. 261–269, 2000.

BOUNATIROU, S.; SMITI, S.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, L.; REJEB, M. N.; NEFFATI, M.; COSTA, M. M.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, v. 105, p. 146-155, 2007.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 115, p. 453–466, 1962.

BRAGA, P. C.; CULICI, M.; ALFIERI, M.; DAL SASSO, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 472–477, 2008.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, p. 141-168, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CABRAL, C.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M.J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; SALGUEIRO, L. *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link as a source of a bioactive and fragrant oil. **Industrial Crops and Products**, n. 43, p. 484–489, 2013.

CAMACHO, A., FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, C.; ALTAREJOS, J.; LAURENT, R. Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. **Rivista Italiana EPPOS**, v. 29, p. 3-8, 2000.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G.; SOUZA, P. A.; BORDIGNON, S. A. L.; MATZENBACHER, N. I. Catálogo palinológico de táxons da família Asteraceae Martinov, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 65, n. 2, p. 201-280, 2010.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, A. H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CHAO, L. K.; HUA, K. F.; HSU, H. Y.; CHENG, S. S.; LIU, J. Y.; CHANG, S. T. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7274-7278, 2005.

CHEN, Y.; LIU, H.; ZHANG, Z.; WANG, S. Preparation of polymeric nanocapsules by radiation induced miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2848-2855, 2007.

CHEN, Q.; LI, P.; H. E. J.; ZHANG, Z.; LIU, J. Supercritical fluid extraction for identification and determination of volatile metabolites from *Angelica dahurica* by GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3218 – 3224, 2008.

CHEN, F.; SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-39, 2009.

CHENG, A. X.; LOU, Y. G.; MAO, Y. B.; LU, S.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179–186, 2007.

CHIFIRIUC, C.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M.; SAVIUC, C.; LAZĂR, V.; ANDRONESCU, E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 209, p. 2-7, 2012.

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

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

CONCANNON, S.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the electrospray ionisation and ion trap fragmentation of hemiterpenoid and dimeric coumarin derivatives. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, p. 2260–2270, 2000.

CORDA, L.; DELOGU, G.; FAVRETTO, D.; MACCIONI, E.; PODDA, G.; SANTANA, L.; TOMASELLI, C.; TRALDI, P.; URIARTE, E. Synthesis and mass spectrometric investigations of some new coumarin derivatives. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 2041–2046, 1998.

COTTIER, F.; PAVELKA, N. Complexity and dynamics of host–fungal Interactions. **Immunologic Research**, v. 53, p. 127–135, 2012.

COY, E. D.; CUCA, L. E.; SEFKOW, M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of *Lauraceae neolignans*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6922-6925, 2009.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Reviews**, n. 87, p. 929-954, 1987.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. **Food Control**, v. 19, p. 346-352, 2008.

DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 454, p. 123–136, 2006.

DEMIRCI, B.; TOYOTA, M.; DEMIRCI, F.; DADANDI, M. Y.; BASER, K. H. C. Anticandidal pimaradiene diterpene from *Phlomis* essential oils. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, p. 612-621, 2009.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R.G.; SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; JR VEIGA, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -Caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.

DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, s. 3, p. 33-39, 2011.

DIONÍSIO, A. P.; CARVALHO, D. D.; PASTORE, G.M. Biotransformation of carotenoids into aroma compounds: screening using solid phase microextraction. **New Biotechnology** – Abstracts, v. 25S, p. S237, 2009.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.

DONSÌ, F.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oil to enhance their antimicrobial activity in foods. **Journal of Biotechnology**, p. 150S:S1-S576, 2010.

ĐORĐEVIĆ, S.; PETROVIĆ, S.; DOBRIĆ, S.; MILENKOVIĆ, M.; VUČIĆEVIĆ, D.; ŽIŽIĆ, S.; KUKIĆ, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 458-463, 2007.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893–1902, 2004.

DUNAND, J.; PAUGAM, A. *In vitro* susceptibility of isolates of *Scytalidium* spp. From superficial lesions against posaconazole. **Pathologie Biologie**, v. 56, p. 268–27, 2008.

ENTSCHLADEN, F.; DRELL, T. L.; LANG, K.; MASUR, K.; PALM, D.; BASTIAN, P.; NIGGEMANN, B.; ZAENKER, K. S. Analysis methods of human cell migration. **Experimental Cell Research**, v. 307, p. 418 – 426, 2005.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. C. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191–196, 2005.

Farmacopéia Brasileira. Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 426p.

FELICETTI, B.; CANE, D. E. Aristolochene synthase: mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 7212-7221, 2004.

FERREIRA, P. M. A.; MÜLLER, S. C.; BOLDRINI, I. I.; EGGERS, L. Floristic and vegetation structure of granitic in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 21-36, 2010.

FIRUZI, O.; ASADOLLAHI, M.; GHOLAMI, M.; JAVIDNIA, K. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. **Food Chemistry**, v. 122, p. 117–122, 2010.

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

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir**, v. 17, p. 2076-2083, 2001.

FUENTES, A. C.; GUTIÉRREZ, E. A.; SEÑORANS, F. J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1568–1575, 2010.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; GADE, A.; RAI, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, p. 382-386, 2009.

GALVANI, F. R.; BARRENECHE, M. L. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Revista FZVA**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 1994.

GRUTKOSKI, P. S.; GRAEBER, C. T.; LIM, Y. P.; AYALA, A.; SIMMS, H. H. α -Defensin 1 (Human Neutrophil Protein 1) as an antichemotactic agent for human polymorphonuclear leukocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2666–2668, 2003.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J. R.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 406–413, 2011.

HANNOUFA, A.; HOSSAIN, Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p.198–202, 2012.

HAOUI, I. E.; DERRICHE, R.; MADANI, L.; OUKALI, Z. Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011.

HAVLICKOVA, B.; FRIEDRICH, M. The advantages of topical combination therapy in the treatment of inflammatory dermatomycoses. **Mycoses**, v. 51, p. 16-26, 2008.

HAY, R. J. *Scytalidium* infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 99-100, 2002.

HOUGHTON, P.; PATEL, N.; JURZYSTA, M.; BIELY, Z.; CHEUNG, C. Antidermatophyte activity of Medicago extracts and contained saponins and their structure-activity relationships. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 1061–1066, 2006.

HULLEY, I. A.; VILJOEN, A. M.; TILNEY, P. M.; VUUREN, S. F. V.; KAMATOU, G. P.P.; WYK, B. E. V. Ethonobotany leaf anatomy, essential oil composition and

antibacterial activity of *Pteronia onobromoides* (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 43-48, 2010a.

HULLEY, I. A.; VILJOEN, A. M.; TILNEY, P. M.; VUUREN, S. F. V.; KAMATOU, G. P.P.; WYK, B. E. V. The ethonobotany, leaf anatomy, essential oil variation and biological activity of *Pteronia incana* (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 668-675, 2010b.

HOSSAIN, M. A.; SHAH, M. D. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011.

JAMALIAN, A.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAIMAND, K.; PASHOOTAN, N.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 308-315, 2012.

JIA, H. L.; JI, Q. L.; XING, S. L.; ZHANG, P. H.; ZHU, G. L.; WANG, X. H. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 75, n. 1, 2010.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; FIGUEIREDO, A. C.; TILNEY, P. M.; VAN ZYL, R. L.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; VAN VUUREN, S. F. Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 102-108, 2007.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v.161, p. 816-823, 2010.

KÖSE, E. O.; DENIZ, I. G.; SARIKURKÇÜ, C.; AKTAS, Ö.; YAVUZ, M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Helder. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P. H. Davis) endemic in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2960-2965, 2010.

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

KUIATE, J.; BESSIÈRE, J. M.; ZOLLO, P. H.; KUATE, S. P. Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p.160–165, 2006.

KÜLKAMP, I. C.; RABELO, B. D.; BERLITZ, S. J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M. D.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A R.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation

improves the *in vitro* antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 1–10, 2011.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

KURDELAS, R. R.; LÓPEZ, S.; LIMA, B.; FERESIN, G. E.; ZYGADLO, J.; ZACCHINO, S.; LÓPEZ, M. L.; TAPIA, A.; FREILE, M. L. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 261–267, 2012.

KUSUMA, I. W.; ARUNG, E. T.; ROSAMAH, E.; PURWATININGSIH, S.; KUSPRADINI, H.; SYAFRIZAL; ASTUTI, J.; KIM, Y.; SHIMIZU, K. Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine americana* grown in Indonesia. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p. 223–226, 2010.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, p. 77–83, 2009.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563–569, 2002.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 209–214, 2008.

LESUEUR, D.; BAN, N. K.; BIGHELLI, A.; MUSELLI, A.; CASANOVA, J. Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC–MS and ¹³C-NMR. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 171–174, 2006.

LIN, C. T.; CHEN, C. J.; LIN, T. Y.; TUNG, J. C.; WANG, S. Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8783–8787, 2008.

LOEUILLE, B. *Stenachaenium* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB105287>).

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, O. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, D. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Asterisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732–1738, 2008.

MAES, D.; DEBENEDETTI, S.; DE KIMPE, N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 165–169, 2006.

MAGGI, F.; MÁRTONFI, P.; CONTI, F.; CRISTALLI, G.; PAPA, F.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. Volatile components of whole and different plant parts of Bastard Balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae) collected in Central Italy and Slovakia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2057-2079, 2011.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends Plants Sciences**, n. 7, p. 366-373, 2002.

MARODIN, S. M.; RITTER, M. J. Estudo taxonômico do gênero *Stenachaenium* Benth. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul. **Iheringia**, n. 48, p. 59-84, 1997.

MARTINS, F. T.; DORIGUETTO, A. C.; SOUZA, T. C.; SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. H.; MOREIRA, M. E. C.; BARBOSA, L. C. A. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 251-258, 2008.

MASTELIC, J.; JERKOVIC, J.; BLAZEVIC, I.; BLAZI, M. P.; BOROVIĆ, S.; BACE, I. I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIC, N.; KOSTIC, K. B.; TOPIC, D. V.; MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3989-3996, 2008.

McGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015-1026, 1995.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, p. 1-12, 2002.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MSAADA, K.; HOSNI, K.; TAARIT, M. B.; CHAHED, T.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1131–1134, 2007.

MULYANINGSIH, S.; YOUNS, M.; EL-READI, M. Z.; ASHOUR, M. L.; NIBRET, E.; SPORER, F.; HERRMANN, F.; REICHLING, J. WINK, M. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 1037–1044, 2010.

NAHAR, A.; ASHRAFUZZAMAN, S.; ISLAM, M. N.; ALAM, M. S. Studies on antidermatophytic effect of *Allamanda cathartica*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 5-7, 2010.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 1–6, 2012.

NAVARRO-MOLL, M. A.; ROMERO, M. C.; MONTILLA, M. P.; VALERO, A. *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L₃ larvae of *Anisakis* type I. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 405–408, 2011.

NUCHUCHUA, O.; SAKULKU, U.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. *In vitro* characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 10, p.1234-1242, 2009.

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 Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, P. C.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; CAMPOS, F. T.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 135, v. 2, p. 393-398, 2011.

ONG, H. M.; MOHAMAD, A. S.; MAKHTAR, N. A.; KHALID, M. H.; KHALID, S.; PERIMAL, E. K.; MASTUKI, S. N.; ZAKARIA, Z., A.; LAJIS, N.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 227-233, 2011.

ORTEGA, N. C. A.; SÁNCHEZ, N. A. Z.; RIVERA, J. R. A.; GONZÁLEZ, C. R.; GUTIÉRREZ, S. P. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 4347-4349, 2005.

OZEN, T.; DEMIRTAS, I.; AKSIT, H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. **Food Chemistry**, v. 124, p. 58–64, 2011.

PANCHAMUKHI, S. I.; MULLA, J. A. S.; SHETTY, N. S.; KHAZI, M. I. A.; KHAN, A. Y.; KALASHETT, M. B.; KHAZI, I. A. Benzothieno [3,2-e][1,2,4] triazolo [4,3-c] pyrimidines: synthesis, characterization, antimicrobial activity and incorporation into solid lipid nanoparticles. **Archiv der Pharmazie**, p. 1-8, 2011.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268-276, 2005.

PANSARIN, E. R.; SALATINO, A.; PEREIRA, A. S. Micromorphological and chemical characteristics of cuticular waxes of *Cleistes* (Orchidaceae, Pogonieae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 79-91, 2008.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170–184, 2009.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323–333, 2007.

PAUL, A.; THAPA, G.; BASU, A.; MAZUMDAR, P.; KALITA, M. C.; SAHOO, L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 366–374, 2010.

PAULA, H. C. P.; SOMBRA, S. M.; ABREU, F. M. O.; PAULA, R. C. M. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by Angico Gum/Chitosan nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359-2366, 2010.

PAVELA, R.; SAJFRTOVÁ, M.; SOVOVÁ, H.; BÁRNET, M.; KARBAN, J. The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 449-454, 2010.

PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **TRENDS Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 166-169, 2005.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1367–1373, 2006.

POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; SILVA, L. M.; SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A. G. B.; ANDRE, E.; WERNER, M. F. P.; MARQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L:

involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 85-92, 2010.

PRASAD, N. P.; ANANDI, C.; BALASUBRAMANIAN, S.; PUGALENDI, K. V. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p.21-24, 2004.

RADULOVIĆ, N. S.; DEKIĆ, M. S.; RANDELOVIĆ, P.J.; STOJANOVIĆ, N. M.; ZARUBICA, A. R.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. Z. Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow *Achillea umbellata* Sibth. et Sm. (Asteraceae) volatiles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2016–2026, 2012.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, p. 749–757, 2012.

RAYMUNDO, L. J. R.; GUILHON, C. C.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ANTONIOLLI, A. R.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 725–732, 2011.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 154–158, 1994.

RIOJA, I.; UBEDA, A.; TERCENIO, M. C.; GUILLÉN, I.; RIGUERA, R.; QUINTELA, J. M.; PEINADOR, C.; GONZÁLEZ, L. M.; ALCARAZ, M. J. An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 397, p. 207–217, 2000.

RITTER, M. R.; BAPTISTA, L. M. Levantamento florístico da família Asteraceae na “Casa de Pedra” e áreas subjacentes, Bagé, Rio Grande do Sul. **Iheringia**, v. 60, n. 1, p. 5-10, 2005.

ROMAGNOLI, C.; BRUNI, R.; ANDREOTTI, E.; RAI, M. K.; VICENTINI, C. B.; MARES, D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. **Protoplasma**, v. 225, p. 57-65, 2005.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews**, v. 11, p. 275-288, 2011.

ROSSELLI, S.; BRUNO, M. A.; MAGGIO, A.; RACCUGLIA, R.; BANCHEVA, S.; SENATORE, F.; FORMISANO, C. Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 426–431, 2009.

SAEI-DEHKORDI, S. S.; TAJIK, H.; MORADI, M.; KHALIGHI-SIGAROODI, F. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1562-1567, 2010.

SAÏDANA, D.; MAHJOUR, M. A.; BOUSSAADA, O.; CHIRIAA, J.; CHÉRAIF, I.; DAAMI, M.; MIGHRI, Z.; HELAL, A. N. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). **Microbiological Research**, v. 163, p. 445—455, 2008.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUAA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAIA, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 105-111, 2012.

SALVIA-TRUJILLO, M. L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 401-407, 2013.

SANDASI, M.; KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Chemotaxonomic evidence suggests that *Eriocephalus tenuifolius* is the source of Cape chamomile oil and not *Eriocephalus punctulatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 328–338, 2011.

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

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SANSUKCHAREARNPON, A.; WANICHWECHARUNGRUNG, S.; LEEPIPATPAIBOON, N.; KERDCHAROEN, T.; ARAYACHUKEAT, S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: preparation and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 267-273, 2010.

SARIKURKCU, C.; OZER, M. S.; ESKICI, M.; TEPE, B.; CAN, S.; METE, E. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1801–1805, 2010.

SAVIUC, C.; GRUMEZESCU, A. M.; OPREA, E.; RADULESCU, V.; DASCALU, L.; CHIFIRIUC, M. C.; BUCUR, M.; BANU, O.; LAZAR, V. Antifungal activity of some vegetal extracts on *Candida* biofilms developed on inert substratum. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 1, p. 15-23, 2011.

SCHOSSLER, P.; SCHNEIDER, G. L.; WUNSCH, D.; SOARES, G. L.; ZINI, C. A. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and

hydrodistillation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 277-287, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. La connaissance des vendeurs ambulants de plantes medicinales dans La zone urbaine de la ville de Porto Alegre – RS – Brasil: une etude Ethnobotanique et Ethnopharmacologique. In: Colloque Européen D´Ethnopharmacologie. **Société Française D´Ethnopharmacologie**, p. 187-188, 1990.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, c. 46, p. 3295-3302, 2008.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 642–645, 2009.

STEELE, C. L.; CROCK, J.; BOHLMANN, J.; CROTEAU, R. Sesquiterpene synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2078–2089, 1998.

STEIN, A. C.; ÁLVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 95–98, 2006.

SUYENAGA, E. S.; KONRATH, E. L.; DRESCH, R. R.; APEL, M. A.; ZUANAZZI, J. A.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, p. 698-704, 2011.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; CROCKETT, S. L.; BAŞER, K. H. C.; WEDGE, D. E. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8430–8435, 2007.

TAKAKI, I.; AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; AMADO, C.A.; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, 741–746, 2008.

TAVARES, A. C.; GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. R. Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 593–598, 2010.

TENORE, G. C.; CIAMPAGLIA, R.; ARNOLD, N. A.; PIOZZI, F.; NAPOLITANO, F.; RIGANO, D.; SENATORE, F. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 238-243, 2011.

TEPE, B.; SOKMEN, M.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden & Scheng. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 335-342, 2005.

TEPE, B.; TEPE, A. S.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 103, p. 766-770, 2007.

THOLL, D.; CHEN, F.; PETRI, J.; GERSHENZON, J.; PICHERSKY, E. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. **The Plant Journal**, v. 42, p. 757-771, 2005.

TOLOUEE, M.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R.; ESLAMIFAR, A.; ZAD, S. J.; JAIMAND, K.; TAEB, J.; REZAEI, M.; KAWACHI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 127-133, 2010.

TOMCZYKOWA, M.; LESZCZYNSKA, K.; TOMCZYK, M.; TRYNISZEWKA, E.; KALEMBRA, D. Composition of the essential oil of *Bidens tripartita* L. roots and its antibacterial and antifungal activities. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 4, p. 428-433, 2011.

TSAI, M. L.; LIN, C. C.; LIN, W. C.; YANG, C. H. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1977-1983, 2010.

TSCHIGGERL, C.; BUCAR, F. Guaianolides and volatile compounds in chamomile tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 129-135, 2012.

TUMEN, I.; AKKOL, E. K.; SÜNTAR, I.; KELEŞ, H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: Preclinical experimental research in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1215-1220, 2011.

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLÁN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Medica**, v. 68, p. 164-167, 2002.

VINHOLE, J.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. Rapid tool for assessment of C₁₃ norisoprenoids in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 47, p. 8398-8403, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; MOHAMADY, M. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ELRAZIK, K. A. A.; OMER, E. A.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SENDRA, E. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptina aromatic plants. **Food Control**, p. 1-8, 2011.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, p. 289–292, 2009.

WEN, Z.; LIU, B.; ZHENG, Z.; YOU, X.; PU, Y.; LI, Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 8, n. 8, p. 1102–1107, 2010.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; THEFELD, K.; RUSTAIYAN, A. Constituents of the essential oil of *Tanacetum* (syn. *Chrysanthemum*) *fruticulosum* Ledeb. from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 112-120, 1999.

WU, S. J.; TEIK, L. Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.1, p. 59-62, 2007.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT – Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

YANG, F. L.; LI, X. G.; ZHU, F.; LEI, C. L. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10156–10162, 2009.

YANG, Y.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; TAI, T.; NUNOURA, Y.; WATANABE, K. Anti-emetic principles of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. **Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 89-93, 1999.

YU, J. Q.; LEI, J. C.; ZHANG, X. Q.; YU, H. D.; TIAN, D. Z.; LIAO, Z. X.; ZOU, G. L. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. **Food Chemistry**, v. 126, 1593–1598, 2011.

YU, Q.; BEYER, P. Reaction specificities of the ϵ -ionone-forming lycopene cyclase from rice (*Oryza sativa*) elucidated *in vitro*. **FEBS Letters**, v. 586, n. 19, p. 3415-3420, 2012.

YU, T.; LEE, J.; LEE, Y. G.; BYEON, S. G.; KIM, M. H.; SOHN, E. H.; LEE, Y. J.; LEE, S. G.; CHO, J. Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 139-147, 2010.

ZAKARIA, Z. A.; MOHAMAD, A. S.; AHMAD, M. S.; MOKHTAR, A. F.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Preliminary analysis of the anti-inflammatory activity

of essential oils of *Zingiber zerumbet*. **Biological Research for Nursing**, v. 13, n. 4, p. 425-432, 2011.

ZELANTE, T.; LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCCHETTI, P.; KASTELEIN, R. A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 2695–2706, 2007.

ZEN, K.; REAVES, T. A.; SOTO, I.; LIU, Y. Response to genistein: Assaying the activation status and chemotaxis efficacy of isolated neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, p. 86– 98, 2006.

ZENG, L.; ZHANG, Z.; LUO, Z.; ZHU, J. Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of *Rhizoma homalomenae*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 456-463, 2011a.

ZENG, W.; ZHU, R.; JIA, L.; GAO, H.; ZHENG, Y.; SUN, Q. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphlium affine*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1322-1328, 2011b.

ZIANI, K.; CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6247–6255, 2011.

ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor, **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 387–410, 1973.

ZHAO, Y.; WANG, C.; CHOW, A. H. L.; REN, K.; GONG, T.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 170–177, 2010.

ZOHRI, A. N.; ABDEL-GAWADL K.; SABER, S. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. **Microbiological Research**, v. 150, p. 167-172, 1995.