

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

ARINE HELOÍSE VIEIRA LOPES JACINTO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE FORMULAÇÃO MICROEMULSIONADA  
PARA O TRATAMENTO DE ONICOMICOSSES CONTENDO  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melissa officinalis* L. E *Cymbopogon  
citratu*s (DC.) Stapf

MANAUS  
2018

ARINE HELOÍSE VIEIRA LOPES JACINTO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA DE FORMULAÇÃO MICROEMULSIONADA  
PARA O TRATAMENTO DE ONICOMICOSSES CONTENDO  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melissa officinalis* L. E *Cymbopogon  
citratatus* (DC.) Stapf

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal do Amazonas, como  
parte do requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa Dra Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi  
Co-Orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS  
2018

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

J12d Jacinto, Arine Heloíse Vieira Lopes  
Desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de  
formulação microemulsionada para o tratamento de onicomicoses  
contendo óleos essenciais de *Melissa officinalis* L. e *Cymbopogon*  
*citratus* (DC.) Stapf / Arine Heloíse Vieira Lopes Jacinto. 2018  
148 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos  
Geraldi

Coorientador: João Vicente Braga de Souza  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Microemulsões. 2. Atividade antifúngica. 3. *Melissa officinalis*  
(erva-cidreira). 4. *Cymbopogon citratus* (capim-limão). 5.  
Onicomicoses. I. Geraldi, Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos  
Santos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

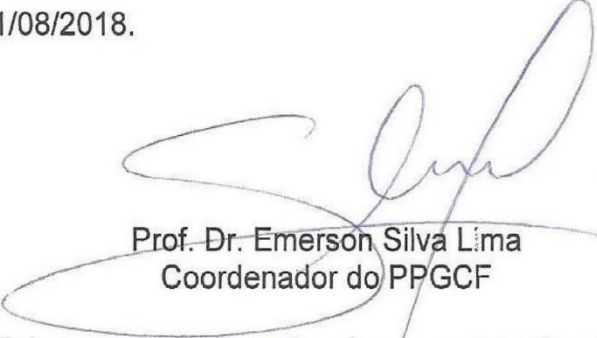
**“Desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de formulação microemulsionada para o tratamento de onicomicoses contendo óleos essenciais de *Melissa officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf”.**

**DISCENTE: ARINE HELOÍSE VIEIRA LOPES JACINTO**

PARECER:


Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 31/08/2018.

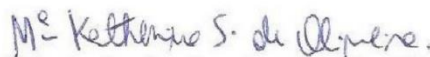


Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coordenador do PPGCF

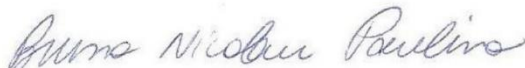
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza  
Coorientador e presidente da banca



Prof.ª. Dr.ª. Maria Katherine Santos de Oliveira - Membro externo  
(CBA)



Prof. Dr. Bruno Nicolau Paulino - Membro interno (UFAM)

*Ao meu avô Roosevelt (in memoriam), à  
minha avó Nelma e aos meus pais pelo  
amor, ensinamentos de vida e dedicação  
de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, por ser tão maravilhoso e me conceder a dádiva da vida, por ser minha fortaleza em todos os momentos e por colocar pessoas queridas no meu caminho que me ajudaram ao longo dessa jornada.

Ao meu pai-avô Roosevelt, que me ensinou tanto nessa vida e me deixou lembranças lindas no coração que viverão para sempre.

A todos os meus familiares pelo incentivo, em especial à minha vó Nelma, à minha mãe Susy, ao meu pai Jorge, aos tios Alessandro, Aldemir, Andrea e Flávia, à minha irmã Amanda, pelo grande auxílio e suporte em todos os momentos. Ao meu namorado Rafael, pelo carinho, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo companheirismo e à sua família pelo carinho e suporte.

À minha orientadora profa. Dra. Kátia Solange pela paciência, pela amizade, por toda a ajuda, incentivo, inspiração, e ensinamentos que me concedeu ao longo do projeto.

Ao meu co-orientador, Dr. João Vicente por todo o auxílio, amizade, incentivo e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Emerson Silva, que sempre me ajudou todas as vezes que precisei, do início ao fim do projeto, dando todo suporte necessário.

À profa Dra Cristina Borborema e à Dra Évelyn Lira por todo carinho, ensinamentos, amizade, inspiração e incentivo.

À profa Tatiane pela paciência, por toda contribuição de conhecimento e por conceder o uso do LIDETEF.

Às professoras Ana Cortez e Kátia Cruz, e à Marielle, por todo auxílio nos testes de susceptibilidade antifúngica, também pela amizade e carinho.

Aos professores José Neto, Débora Ohana, Maria Zeli e Fernanda Guilhon que muito me auxiliaram e sempre me estimulavam ao nos encontrarmos pela FCF.

À profa. Dra. Ellen Paes, e aos técnicos Dorothea e Allan, pela amizade e por toda a ajuda de sempre.

Ao prof. Dr. Antônio Batista, que me ajudou bastante sempre que precisei.

Ao prof. Dr. Jesus Amado, que me deu todo o suporte durante os testes de caracterização.

À profa. Dra. Cynthia Tereza, que gentilmente me cedeu o seu refratômetro para realização dos meus testes, me ajudando todas as vezes que foi necessário.

Ao prof. Dr. Bruno Nicolau e à profa. Dra. Maria Katherine, por terem aceito compor a minha banca de defesa e por todas as importantes contribuições concedidas a este projeto.

Aos técnicos Newton, Roberto, José Maria, Raimundo, Francisco e Vanuza que muito me ajudaram durante a execução dos experimentos.

À dona Imarita, por toda a ajuda e incentivo de sempre.

À Keiti, Geane e Cléo que tanto me ajudaram sempre que precisei de algo.

Aos amigos do grupo de oração, e também à tia Andréia, Priscilla, Jhone e Elizângela, que muitas vezes me ajudaram com conselhos e em oração.

Aos amigos do laboratório, do mestrado e da vida: Silviane, Rodrigo Lima, Walter, Eduardo, Rodrigo Ribeiro, Deyze, Letícia, Rodrigo Silva, Carolina Valentim, Kamila, Sayuri, Natasha, Fabrício, Caroline Freitas, Lawrence, Eny, Fernanda, Patrícia, Serafim, Beatriz, Michele, Luan, Leonardo, Luciana, Ingrid, Taylah e Sara por terem estado muito presentes na minha vida durante essa etapa e me ajudarem muito de várias formas, onde partilhamos de momentos muito divertidos.

Ao Wanger e à Heloísa do LACQUA, que me auxiliaram e foram muito prestativos quando precisei de ajuda com o condutivímetro.

À Márcia Silva, que gentilmente realizou o teste de citotoxicidade de minhas amostras e à Leilane e Ellen que também me auxiliaram bastante na compreensão do teste com muita paciência.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para que eu chegasse até aqui.

**Agradeço imensamente!**

*Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo seu propósito.*

*Rm 8:28*



## RESUMO

A onicomicose é uma infecção fúngica de distribuição mundial que causa a destruição da unha (dano estético) e pode prejudicar a qualidade de vida social do paciente, interferindo na sua auto-estima e capacidade funcional. Os principais agentes causadores da doença são a *Candida albicans* e o *Trichophyton rubrum*. Atualmente, a resistência fúngica aos fármacos presentes no mercado é uma problemática que vem estimulando a pesquisa por novos medicamentos para o tratamento dessa infecção, e os óleos essenciais tem revelado conter substâncias potencialmente antifúngicas. Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo desenvolver formulações microemulsionadas contendo óleos essenciais para o tratamento de onicomicoses. Inicialmente, testou-se a atividade dos óleos essenciais de oito plantas: *Aniba parviflora*, *Aniba rosaeodora*, *Aniba canelilla*, *Ocotea cymbarum*, *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), e *Cinnamomum camphora*, frente a cepas ATCC de *T. rubrum* e *C. albicans*. O método adotado foi a microdiluição em caldo. Os óleos mais ativos contra os fungos foram os de *M. officinalis* (m) e *C. citratus* (c), que apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) entre 400 e 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e, por isso, foram selecionados para serem incorporados nas microemulsões (MEs). Antes, realizou-se o teste de miscibilidade para verificar se tais óleos essenciais seriam miscíveis nos insumos escolhidos para compor os sistemas. Então, foram preparadas bases microemulsionadas com diferentes combinações de tensoativos (Tween<sup>®</sup> 20, Tween<sup>®</sup> 80 e Kolliphor<sup>®</sup> EL), cotensoativos (Trascutol<sup>®</sup> P e os álcoois etílico e isopropílico), fase oleosa (ácido oleico) e água, cujas proporções foram determinadas pela construção de diagramas de fases pseudoternários, os quais também possibilitaram a escolha das melhores regiões de MEs. Os óleos (m e c) foram, então, incorporados como fases oleosas nas formulações bases, obtendo-se um total de vinte MEs que foram submetidas novamente a ensaio antifúngico a fim de verificar e comparar a atividade das MEs bases com as MEs contendo os óleos essenciais frente aos patógenos estudados. Assim, selecionou-se as cinco MEs com maior ação antifúngica – todas contendo o óleo m (B<sub>m</sub>, E<sub>m</sub>, G<sub>m</sub>, H<sub>m</sub>, e I<sub>m</sub>) – e realizou-se ensaios físico-químicos e de citotoxicidade. As formulações G<sub>m</sub> e H<sub>m</sub> foram consideradas as melhores, pois, na caracterização físico-química, seus valores de viscosidade indicaram boa fluidez (G<sub>m</sub>: 10,43 cP e H<sub>m</sub>: 9,0 cP); transparência, visto que apresentaram índices de refração (G<sub>m</sub>: 1,380 e H<sub>m</sub>: 1,379) e transmitâncias (G<sub>m</sub>: 99,50% e H<sub>m</sub>: 99,23%) próximos aos da água; os valores de condutividade elétrica confirmaram que são MEs do tipo O/A (G<sub>m</sub>: 55,7  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  e H<sub>m</sub>: 76,8  $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ); os tamanhos de suas gotículas (G<sub>m</sub>: 81,9 nm e H<sub>m</sub>: 108,0 nm), seus índices de polidispersão (G<sub>m</sub>: 0,239 e H<sub>m</sub>: 0,215) e os valores de potencial zeta (G<sub>m</sub>: -0,50 mV e H<sub>m</sub>: -4,73 mV) confirmaram suas estabilidades; e seus valores de pH (G<sub>m</sub>: 4,39 e H<sub>m</sub>: 4,13) foram compatíveis com o da pele e da unha. O teste de citotoxicidade foi realizado em fibroblastos de pulmão humano e constatou-se que as MEs G<sub>m</sub> e H<sub>m</sub> são atóxicas (CI<sub>50%</sub> > 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Portanto, o estudo obteve duas promissoras formulações microemulsionadas para o tratamento tópico de onicomicoses causadas por *T. rubrum* e *C. albicans*.

**Palavras-chaves:** Microemulsões. Atividade antifúngica. *Melissa officinalis* (erva-cidreira). *Cymbopogon citratus* (capim-limão). Onicomicoses.

## ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection of worldwide distribution that causes nail destruction (aesthetic damage) and may impair the patient's social quality of life, interfering in his self-esteem and functional capacity. The disease main causative agents are *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*. Currently, the fungal resistance to the drugs present in the market is a problem that has stimulated the research for new drugs to treat this infection, and essential oils have been shown to contain potentially antifungal substances. Thus, this work had as main objective to develop microemulsion formulations containing essential oils for the treatment of onychomycosis. Initially, the eight plants essential oils activity was tested: *Aniba parviflora*, *Aniba rosaeodora*, *Aniba canelilla*, *Ocotea cymbarum*, *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum camphora*, against ATCC strains of *T. rubrum* and *C. albicans*. The adopted method was broth microdilution. The most active oils against fungi were *M. officinalis* (m) and *C. citratus* (c), which had minimum inhibitory concentrations (MICs) between 400 and 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and were therefore selected to be incorporated in the microemulsions (MEs). Before, the miscibility test was performed to verify if such essential oils would be miscible in the inputs chosen to compose the systems. Then, microemulsion bases were prepared with different combinations of surfactants (Tween<sup>®</sup> 20, Tween<sup>®</sup> 80 and Kolliphor<sup>®</sup> EL), cosurfactants (Trascutol<sup>®</sup> P and ethyl and isopropyl alcohols), oil phase (oleic acid) and water, whose proportions were determined by the construction of pseudoternary-ternary phase diagrams, which also enabled the choice of the best MEs regions. The oils (m and c) were then incorporated as oily phases in the base formulations, resulting in a total of twenty MEs which were rescreened in antifungal assay in order to verify and compare the activity of the bases MEs with the MEs containing the essential oils against the studied pathogens. Thus, the five MEs with the highest antifungal action – all containing the oil m (B<sub>m</sub>, E<sub>m</sub>, G<sub>m</sub>, H<sub>m</sub>, and I<sub>m</sub>) – were selected and physico-chemical and cytotoxicity tests were performed. The G<sub>m</sub> and H<sub>m</sub> formulations were considered the best, because in the physicochemical characterization, their viscosity values indicated good fluidity (G<sub>m</sub>: 10,43 cP and H<sub>m</sub>: 9,0 cP); transparency, since they presented refractive indexes (G<sub>m</sub>: 1,380 and H<sub>m</sub>: 1,379) and transmittance (G<sub>m</sub>: 99.50% and H<sub>m</sub>: 99.23%), close to that of water; the electrical conductivity values confirmed that they are O/A types MEs (G<sub>m</sub>: 55.7  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  and H<sub>m</sub>: 76.8  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); their droplet sizes (G<sub>m</sub>: 81.9 nm and H<sub>m</sub>: 108.0 nm); their polydispersity indexes (G<sub>m</sub>: 0.239 and H<sub>m</sub>: 0.215) and zeta potential values (G<sub>m</sub>: -0.50 mV and H<sub>m</sub>: -4.73 mV) confirmed their stabilities and; their pH values (G<sub>m</sub>: 4.39 and H<sub>m</sub>: 4.13) were compatible with that of the skin and nail. The cytotoxicity test was performed on human lung fibroblasts and it was found that the MEs G<sub>m</sub> and H<sub>m</sub> are non-toxic (IC<sub>50%</sub> > 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Therefore, the study obtained two promising microemulsion formulations for the topical treatment of onychomycoses caused by *T. rubrum* and *C. albicans*.

**Key-words:** Microemulsions. Antifungal activity. *Melissa officinalis* (lemon balm). *Cymbopogon citratus* (lemon grass). Onychomycosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Estruturas químicas dos principais antifúngicos usados em tratamentos sistêmicos de onicomicoses. **Fonte:** PubChem, 2018.....33
- Figura 1.2.** Estruturas químicas dos principais antifúngicos usados em tratamentos tópicos de onicomicoses. **Fonte:** PubChem, 2018.....34
- Figura 1.3.** Ilustração das estruturas químicas dos compostos isopreno, mono- e sesquiterpenóides, e da conformação cabeça-a-cauda. **Fonte:** Simões *et al.*, 2003.....36
- Figura 1.4.** Árvore da planta *A. parviflora* e a estrutura química do linalol. **Fontes:** Batista, 2014; PubChem, 2018.....38
- Figura 1.5.** Árvore da planta *A. rosaeodora* e estrutura química do linalol. **Fontes:** Lorenzi, 2013; PubChem, 2018.....40
- Figura 1.6.** Folhas e flores da planta *A. canelilla* e estrutura química do 1-nitro-2-feniletano. **Fontes:** Useful Tropical Plants Database, 2018; PubChem, 2018.....41
- Figura 1.7.** Árvore da planta *O. cymbarum* e estruturas químicas do safrol e da burchelina. **Fontes:** Marinho e Wittman, 2018; PubChem, 2018.....42
- Figura 1.8.** Folhas da planta *M. officinalis* e estruturas químicas do citral e do citronelal. **Fontes:** Shakeri, Amirhossein e Javadi, 2016; PubChem, 2018.....43
- Figura 1.9.** Árvore da planta *C. camphora* e estruturas químicas dos principais componentes de seu óleo essencial: D-cânfora, linalol e 1,8-cineol. **Fontes:** Serralves, 2018; PubChem, 2018.....45
- Figura 1.10.** Folhas da planta *C. citratus* e estrutura química do citral. **Fontes:** Sorocaba, 2018; PubChem, 2018.....46
- Figura 1.11.** Folhas e frutos da planta *P. nigrum* e estruturas químicas do  $\beta$ -cariofileno, do limoneno e da piperina. **Fontes:** Simões *et al.*, 2003; CEPLAC, 2018; PubChem, 2018.....48
- Figura 1.12.** Exemplo de procedimento de microdiluição em caldo para verificação de ação inibitória das amostras de óleos essenciais sobre as cepas fúngicas. **Fonte:** A autora.....51
- Figura 2.1.** Tipos de MEs: **a.** O/A; **b.** A/O; **c.** Estruturas bicontínuas. **Fontes:** Adaptado de Silva *et al.*, 2015 e de Souza Filho e Serra, 2015.....80
- Figura 2.2.** Ilustração demonstrando os tipos de sistema segundo a classificação de Winsor. **Fonte:** A autora.....82
- Figura 2.3.** Diagrama ternário hipotético demonstrando esquematicamente regiões de MEs. **Fonte:** adaptado de Mehta e Kaur, 2011.....82
- Figura 2.4.** Formação de regiões de ME em modelos de diagramas de fase. **a.** diagrama ternário; **b.** diagrama quaternário; **c.** diagrama pseudoternário. **Fonte:** adaptado de Rossi *et al.*, 2007.....83

<b>Figura 2.5.</b> Representação gráfica da construção de pontos de ME em um modelo de diagrama pseudoternário. <b>Fonte:</b> Oliveira <i>et al.</i> , 2017.....	84
<b>Figura 2.6.</b> Fotografias ilustrando todas as fases formadas. <b>1.</b> WII; <b>2.</b> Emulsão clássica; <b>3.</b> Gel; <b>4.</b> Separação dos constituintes (O + A + C/T); <b>5.</b> ME (WIV). <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal da autora.....	92
<b>Figura 2.7.</b> Ilustração demonstrando a composição e as fases dos Diagramas 1 e 2. <b>Diagrama 1:</b> fase oleosa = miristato de isopropila; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor <sup>®</sup> EL; cotensoativo = etanol. <b>Diagrama 2:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor <sup>®</sup> EL; cotensoativo = etanol. <b>Fases formadas:</b> WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.....	93
<b>Figura 2.8.</b> Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 3 e 4. <b>Diagrama 3:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor <sup>®</sup> EL; cotensoativo = álcool isopropílico. <b>Diagrama 4:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor <sup>®</sup> EL; cotensoativo = Transcutol <sup>®</sup> P. <b>Fases formadas:</b> WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.....	94
<b>Figura 2.9.</b> Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 5, 6 e 7. <b>Diagrama 5:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 80; cotensoativo = etanol. <b>Diagrama 6:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 80; cotensoativo = álcool isopropílico. <b>Diagrama 7:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 80; cotensoativo = Transcutol <sup>®</sup> P. <b>Fases formadas:</b> WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.....	95
<b>Figura 2.10.</b> Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 8, 9 e 10. <b>Diagrama 8:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 20; cotensoativo = etanol. <b>Diagrama 9:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 20; cotensoativo = álcool isopropílico. <b>Diagrama 10:</b> fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween <sup>®</sup> 20; cotensoativo = Transcutol <sup>®</sup> P. <b>Fases formadas:</b> WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.....	96
<b>Figura 2.11.</b> Fotografias das formulações bases e com óleos essenciais de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i> incorporados a 5% como fase oleosa. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal da autora.....	99
<b>Figura 4.1.</b> Demonstração do fenômeno da refração da luz através da água. <b>Fonte:</b> Adaptado de BrasEq, 2018; Gil, 2010.....	123
<b>Figura 4.2.</b> Transmissão e absorção da luz através de uma solução. <b>Fonte:</b> Adaptado de Cienfuegos e Vaitsman, 2000.....	124
<b>Figura 4.3.</b> Ilustração esquematizando a obtenção do tamanho de gotículas e índice de polidispersão através do método de DLS. <b>Fonte:</b> Adaptado de Wikipedia, 2010; Particular Science, 2018; PTL, 2018.....	125
<b>Figura 4.4.</b> Ilustração demonstrando a carga de superfície existente ao redor das gotículas que pode ser determinada pelo potencial Zeta. <b>Fonte:</b> Sinko, 2008, com modificações.....	126
<b>Figura 4.5.</b> Reogramas representativos do comportamento de materiais correspondendo a fluidos newtonianos, e fluidos não newtonianos plásticos, pseudoplásticos e fluxo dilatante. <b>Fonte:</b> Adaptado de Sinko, 2008.....	128

<b>Figura 4.6.</b> Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Bm.....	137
<b>Figura 4.7.</b> Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Em.....	137
<b>Figura 4.8.</b> Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Gm.....	138
<b>Figura 4.9.</b> Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Hm.....	138
<b>Figura 4.10.</b> Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Im.....	138

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1.</b> Incidência dos agentes etiológicos mais reportados como causadores de onicomicoses no mundo. <b>Fontes:</b> Gupta <i>et al.</i> , 2017, com adaptações; Sigurgeirsson e Baran, 2014.....	27
<b>Quadro 2.1.</b> Principais diferenças entre sistemas macro, nano e microemulsionados. <b>Fontes:</b> Adaptado de Gupta <i>et al.</i> , 2016; Nastiti <i>et al.</i> , 2017.....	78
<b>Quadro 2.2.</b> Insumos estudados para compor as MEs.....	88
<b>Quadro 2.3.</b> Teste de miscibilidade dos óleos de erva-cidreira e capim-limão com os demais constituintes das MEs.....	91
<b>Quadro 2.4.</b> Composição estudada em cada diagrama.....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Incidência dos agentes etiológicos mais reportados como causadores de onicomicoses em cidades distribuídas pelas cinco regiões do Brasil.....	29
<b>Tabela 1.2.</b> Demonstração da diluição seriada das amostras por cada poço da microplaca.....	51
<b>Tabela 1.3.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais analisados contra cepas de <i>C. albicans</i> e <i>T. rubrum</i> .....	53
<b>Tabela 2.1.</b> Proporção pré-estabelecida entre os componentes antes da titulação, considerando a razão C/T de 1:1.....	89
<b>Tabela 2.2.</b> Composição dos pontos selecionados dentro das regiões de ME de cada um dos dez diagramas pseudoternários.....	98

<b>Tabela 2.3.</b> Composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i> incorporados como fases oleosas.....	100
<b>Tabela 3.1.</b> Relação de alguns estudos que realizaram o desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana de MEs e outras dispersões coloidais contendo óleos essenciais.....	107
<b>Tabela 3.2.</b> Atividade antifúngica (CIM) e composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i> .....	111
<b>Tabela 3.2.</b> (Cont.) Atividade antifúngica (CIM) e composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i> .....	112
<b>Tabela 4.1.</b> Valores referentes ao ensaio de viscosidade das MEs estudadas.....	134
<b>Tabela 4.2.</b> Valores referentes aos ensaios de índice de refração e transmitância das formulações estudadas.....	136
<b>Tabela 4.3.</b> Valores referentes aos ensaios de tamanho de gotícula, PDI e potencial Zeta das ME estudadas.....	137
<b>Tabela 4.4.</b> Valores de índice de condutividade elétrica e pH das formulações Bm, Em, Gm, Hm e Im.....	139
<b>Tabela 4.5.</b> Valores de viabilidade celular do óleo essencial e das MEs testados na linhagem MRC-5, após 24 horas de exposição. Os dados estão representados como CI <sub>50%</sub> (intervalo de confiança de 95%).....	141

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 4.1.</b> Comportamento da variação de viscosidade versus velocidade de agitação das formulações testadas.....	135
<b>Gráfico 4.2.</b> Comportamento reológico das formulações testadas.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>mm</b>	Milímetro
<b>PRB®</b>	Produtos Regionais da Amazônia
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>TSA</b>	Teste de susceptibilidade antifúngica
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>mL</b>	Mililitro
<b>g.L<sup>-1</sup></b>	Gramas por litro
<b>UFC.mL<sup>-1</sup></b>	Unidade de formação de colônias por mililitros
<b>mg.mL<sup>-1</sup></b>	Miligrama por mililitros
<b>mg</b>	Miligrama
<b>µL</b>	Microlitro
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>µg.mL<sup>-1</sup></b>	Microgramas por mililitros
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>v/v</b>	Percentual de concentração em volume por volume
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>ME</b>	Microemulsão
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>EHL</b>	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
<b>RW</b>	Razão de Winsor
<b>WI</b>	Winsor I
<b>WII</b>	Winsor II
<b>WIII</b>	Winsor III
<b>WIV</b>	Winsor IV
<b>A/T</b>	Relação água e tensoativo
<b>C/T</b>	Relação ou razão co-tensoativo e tensoativo

<b>g</b>	Gramas
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>AO</b>	Ácido oleico
<b>MI</b>	Miristato de isopropila
<b>KEL</b>	Kolliphor® EL
<b>TW80</b>	Tween® 80
<b>TW20</b>	Tween® 20
<b>TOLP</b>	Transcutol® P
<b>PG</b>	Propilenoglicol 400
<b>AE</b>	Álcool etílico
<b>AI</b>	Álcool isopropílico
<b>C</b>	Cotensoativo
<b>T</b>	Tensoativo
<b>m</b>	<i>Melissa officinalis</i>
<b>c</b>	<i>Cymbopogon citratus</i>
<b>O+A+C/T</b>	Separação de óleo, água, cotensoativo e tensoativo
<b>0</b>	Formulações bases
<b>B<sub>0</sub></b>	Formulação base do ponto B
<b>E<sub>0</sub></b>	Formulação base do ponto E
<b>G<sub>0</sub></b>	Formulação base do ponto G
<b>H<sub>0</sub></b>	Formulação base do ponto H
<b>I<sub>0</sub></b>	Formulação base do ponto I
<b>B<sub>m</sub></b>	Formulação do ponto B contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i>
<b>B<sub>c</sub></b>	Formulação do ponto B contendo óleo essencial de <i>C. citratus</i>
<b>B<sub>m+c</sub></b>	Formulação do ponto B contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i>
<b>E<sub>m</sub></b>	Formulação do ponto E contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i>
<b>E<sub>c</sub></b>	Formulação do ponto E contendo óleo essencial de <i>C. citratus</i>
<b>E<sub>m+c</sub></b>	Formulação do ponto E contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i>
<b>G<sub>m</sub></b>	Formulação do ponto G contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i>
<b>G<sub>c</sub></b>	Formulação do ponto G contendo óleo essencial de <i>C. citratus</i>



<b>G<sub>m+c</sub></b>	Formulação do ponto G contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i>
<b>H<sub>m</sub></b>	Formulação do ponto H contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i>
<b>H<sub>c</sub></b>	Formulação do ponto H contendo óleo essencial de <i>C. citratus</i>
<b>H<sub>m+c</sub></b>	Formulação do ponto H contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i>
<b>I<sub>m</sub></b>	Formulação do ponto I contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i>
<b>I<sub>c</sub></b>	Formulação do ponto I contendo óleo essencial de <i>C. citratus</i>
<b>I<sub>m+c</sub></b>	Formulação do ponto I contendo óleo essencial de <i>M. officinalis</i> e <i>C. citratus</i>
<b>η</b>	Índice de refração
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering)
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão (polydispersity index)
<b>ξ</b>	Potencial Zeta
<b>UV/VIS</b>	UV visível
<b>I<sub>i</sub></b>	Luz incidente
<b>I<sub>e</sub></b>	Luz emergente ou transmitida
<b>T<sub>r</sub></b>	Transmitância
<b>Dτ</b>	Coefficiente de difusão translacional
<b>f</b>	Valor de cedência
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>c</b>	Centímetro
<b>μS.cm<sup>-1</sup></b>	Microsiemens por centímetro
<b>BIOPHAR</b>	Laboratório de Atividade Biológica
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>DMEM</b>	Dulbeco's Modified Eagle Medium
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>cP</b>	Centipoise
<b>γ</b>	Taxa de cisalhamento
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>mV</b>	Milivolts
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>CI<sub>50%</sub></b>	Concentração Inibitória para 50% das células

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	21
REFERÊNCIAS .....	23
CAPÍTULO 1 .....	25
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA <i>Candida albicans</i> e <i>Trichophyton rubrum</i> , CAUSADORES DE ONICOMICOSE .....	26
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
1.1.1 Onicomicose .....	26
1.1.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	30
1.1.1.2 <i>Candida albicans</i> .....	31
1.1.1.3 Tratamento.....	31
1.1.2 Óleos essenciais .....	35
1.1.2.1 Gênero <i>Aniba</i> Aubl. ....	37
1.1.2.1.1 <i>Aniba parviflora</i> (Meisn) Mez. ....	38
1.1.2.1.2 <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke .....	39
1.1.2.1.3 <i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez.....	41
1.1.2.2 <i>Ocotea cymbarum</i> H. B. Kunth .....	42
1.1.2.3 <i>Melissa officinalis</i> L. ....	43
1.1.2.4 <i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Pres.....	44
1.1.2.5 <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf .....	46
1.1.2.6 <i>Piper nigrum</i> L. ....	47
1.2 METODOLOGIA.....	49
1.2.1 Descrição das amostras .....	49
1.2.2 Teste de susceptibilidade antifúngica (TSA).....	49
1.2.2.1 Preparo do inóculo .....	49
1.2.2.2 Diluição das substâncias testes .....	50
1.2.2.3 Microdiluição em placa .....	50

1.2.2.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	51
1.2.2.5 Seleção dos óleos com maior potencial antifúngico .....	52
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
1.4 REFERÊNCIAS .....	60
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	77
<b>CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Melissa officinalis</i> L. E <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C) Stapf.....</b>	78
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	78
2.1.1 Microemulsões .....	78
2.1.2 Tipos de Microemulsão .....	79
2.1.3 Classificação de Winsor .....	81
2.1.4 Construção dos diagramas e delimitação da região de microemulsão .....	82
2.1.5 Fatores que afetam a região de microemulsão.....	84
2.2 METODOLOGIA.....	88
2.2.1 Teste de miscibilidade e seleção dos componentes.....	88
2.2.2 Construção dos diagramas.....	89
2.2.3 Incorporação dos óleos essenciais nas microemulsões .....	89
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
2.3.1 Teste de miscibilidade .....	91
2.3.2 Construção dos diagramas de fases .....	92
2.3.3 Seleção das microemulsões .....	98
2.3.4 Incorporação dos óleos essenciais nas microemulsões .....	98
2.4 REFERÊNCIAS .....	101
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	104
<b>CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS MICROEMULSÕES.....</b>	105
3.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	105
3.2 METODOLOGIA .....	109
3.2.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	109

<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	110
<b>3.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)</b> .....	110
<b>3.4 REFERÊNCIAS</b> .....	119
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	122
<b>CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES E TESTE DE CITOTOXICIDADE</b> .....	123
<b>4.1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	123
<b>4.2 METODOLOGIA</b> .....	131
<b>4.2.1 Caracterização físico-química das microemulsões</b> .....	131
<b>4.2.1.1 Índice de refração</b> .....	131
<b>4.2.1.2 Determinação do pH das microemulsões</b> .....	131
<b>4.2.1.3 Transmitância</b> .....	131
<b>4.2.1.4 Condutividade elétrica</b> .....	131
<b>4.2.1.5 Determinação da viscosidade e comportamento reológico</b> .....	131
<b>4.2.1.6 Determinação do tamanho de gotícula, potencial Zeta e PDI</b> .....	132
<b>4.2.2 Teste de citotoxicidade</b> .....	132
<b>4.2.2.1 Células</b> .....	132
<b>4.2.2.2 Ensaio de viabilidade celular: método de Alamar Blue</b> .....	132
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	134
<b>4.4 REFERÊNCIAS</b> .....	143
<b>CONCLUSÕES</b> .....	148

## INTRODUÇÃO

A onicomicose foi tradicionalmente conceituada como uma infecção não dermatofítica da unha, mas atualmente é referida como um termo geral para denotar qualquer infecção da placa ungueal ocasionada por fungos. Apesar de haver poucos dados disponíveis a respeito da doença em países tropicais, é considerada uma das mais importantes onicopatias, chegando a acometer 5,5% da população mundial. Tal infecção deve ser tratada não somente pelo dano fisiológico e estético que acarreta, mas também por prejudicar a qualidade de vida do paciente, a auto-estima e a sua capacidade funcional, interferindo nas suas atividades rotineiras (ELEWSKI, 1998; LACAZ, 2002; ADEKHANDI; PAL, SHARMA, 2015).

Embora haja uma boa definição dos grupos de agentes causadores das onicomicoses, a alta prevalência da patologia persiste devido à dificuldade do diagnóstico clínico laboratorial, à coleta inapropriada do material para análise e à ineficácia do tratamento, pois existem poucas opções de medicamentos antifúngicos no mercado para a terapia dessas infecções, acrescido o fato de que as recidivas são rápidas e frequentes após a suspensão da terapia medicamentosa em função da presença de estruturas reprodutíveis resistentes ao tratamento medicamentoso (ZANARDI *et al.*, 2008).

Quando se trata de terapias medicamentosas para onicomicose, conta-se basicamente com três opções de tratamento: tópico, sistêmico e a combinação das duas terapias. Os medicamentos sistêmicos são os mais eficazes, porém apresentam efeitos colaterais e riscos de interações medicamentosas. Já a terapia tópica é uma opção de tratamento atraente devido a não invasividade, facilidade de administração, capacidade de direcionar o tratamento local da infecção, risco mínimo de eventos adversos sistêmicos e interações medicamentosas, o que gera boa adesão ao tratamento por parte do paciente (RUIZ; CHIACCHIO, 2004; LECHA *et al.*, 2005; GUNT; KASTING, 2007; GUPTA *et al.*, 2013).

A eficácia terapêutica de uma formulação tópica depende tanto das propriedades físico-químicas da substância ativa quanto do tipo de veículo empregado na fabricação do medicamento, uma vez que a baixa penetração do veículo na área afetada pode responder pela inefetividade tópica de um fármaco antifúngico (BHOWMIK *et al.*, 2012). Nesse sentido, muita atenção tem sido dada aos sistemas microemulsionados como novos sistemas de administração de fármacos, devido à sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, através de seu direcionamento específico ao sítio de ação, permitindo a redução da dose administrada

e dos efeitos tóxicos potenciais dos fármacos, além de ser capaz de modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade, absorção e da biodisponibilidade dos mesmos (FORMARIZ *et al.*, 2005; SOLANKI *et al.*, 2012 ; OZGENC *et al.*, 2016).

Tendo em vista que, no tratamento da onicomicose, poucos são os medicamentos considerados eficazes, as plantas que apresentam substâncias farmacologicamente ativas e seus derivados podem surgir como uma atraente alternativa. As plantas aromáticas são capazes de produzir substâncias com propriedades farmacológicas, denominadas óleos essenciais, que são compostos voláteis, altamente aromáticos, de baixo peso molecular e largamente empregados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia devido às suas inúmeras atividades biológicas, dentre elas antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária, inseticida, antitumoral e antioxidante (KUMAR *et al.*, 2018; NAEEM *et al.*, 2018).

Apesar dos poucos relatos na literatura de formulações farmacêuticas micromeulsionadas contendo óleos vegetais como fase oleosa, alguns estudos demonstram que as microemulsões conseguem melhorar as propriedades farmacêuticas e biofarmacêuticas dos compostos bioativos derivados destes óleos (DANTAS *et al.*, 2009; XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2017).

Portanto, o desenvolvimento de novas formulações micremulsionadas contendo óleos essenciais revela-se uma vantajosa alternativa à terapêutica medicamentosa convencional, uma vez que são de fácil aplicação e capazes de induzir à cura das unhas acometidas pelos fungos causadores da onicomicose de forma segura e eficaz.

O objetivo deste trabalho é desenvolver formulações microemulsionadas para o tratamento de onicomicoses, contendo óleos essenciais de origem vegetal como ativos antifúngicos. Neste contexto, esta dissertação está estruturada em quatro capítulos. O Capítulo 1 fará uma síntese sobre a doença onicomicose e sobre os óleos essenciais que terão sua atividade antifúngica testada frente às cepas de dois dos principais agentes causadores de onicomicose: *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. O Capítulo 2 trará uma revisão sobre a tecnologia das microemulsões e os testes realizados para a obtenções de formulações contendo óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melissa officinalis*, bem como a construção de diagramas de fases pseudoternários. O Capítulo 3 trará uma revisão de literatura sobre as aplicações das microemulsões contendo óleos essenciais já desenvolvidas e o teste de susceptibilidade antifúngica realizado nas microemulsões que foram preparadas no Capítulo 2,

além de selecionar aquelas que apresentaram maior atividade antifúngica para as próximas etapas, que consistiram nos ensaios de caracterização físico-química e avaliação de citotoxicidade, abordados no Capítulo 4.

## REFERÊNCIAS

ADEKHANDI, S.; PAL, S.; SHARMA, N.; JUYAL, D.; SHARMA, M.; DIMRI, D. Incidence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting a tertiary care hospital in India. **Cutis**, v. 95, n. 1, p. E20-E25, 2015.

BHOWMIK, D.; GOPINATH, H.; KUMAR, B. P.; DURAIVEL, S.; KUMAR, K. P. S. Recent advances in novel topical drug delivery system. **The Pharma Inovattion**, v. 1, n. 9, p. 12-31, 2012.

DANTAS, T. N. C.; SILVA, H. S. R. C.; DANTAS NETO, A. A.; MARCUCCI, M. C.; MACIEL, M. A. M. Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 368-375, 2010.

ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 415-429, 1998.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

GUNT, H. B.; KASTING, G. B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 254-260, 2007.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544-554, 2013.

KUMAR, Y.; PRAKASH, O.; TRIPATHI, H.; TANDON, S.; GUPTA, M. M.; RAHMAN, L. U.; LAL, R. K.; SEMWAL, M.; DAROKAR, M. P.; KHAN, F. AromaDb: A database of medicinal and aromatic plant's aroma molecules with phytochemistry and therapeutic potentials. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1081, p. 1-11, 2018.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 292p.

LECHA, M.; EFFENDY, I.; CHAUVIN, M. F.; DI CHIACCHIO, N.; BARAN, R.; Treatment options - development of consensus guideline. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, n. 19, p. 25-33, 2005.

NAEEM, A.; ABBAS, T.; ALI, T. M.; HASNAIN, A. Essential Oils: brief background and uses. **Remedy Publications LLC, Annals of Short Reports**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2018.

OZGENC, E.; EKINCI, M.; OZDEMIR, D.; GUNDOGDU, E.; ASIKOGLU, M. Microemulsion drug delivery systems for radiopharmacy studies. **International Journal of Medical Research & Health Sciences**, v. 5, n. 11, p. 311-317, 2016.

RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. D. Manual de conduta nas onicomicoses: diagnóstico e tratamento. In: Sociedade Brasileira de Dermatologia. Manual de Conduta. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, p. 191-201, 2004.

SOLANKI, S. S.; SARKAR, B.; DHANWANI, R. K. Microemulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of ampelopsin. **International Scholarly Research Notices Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1-4, 2012.

ZANARDI, D.; NUNES, D. H.; PACHECO, A. S.; TUBONE, M. Q.; SOUZA FILHO, J. J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 2, p. 119–124, 2008.



# CAPÍTULO 1

## **CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, CAUSADORES DE ONICOMICOSSES**

### **1.1 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **1.1.1 Onicomicose**

A onicomicose é uma infecção fúngica crônica capaz de levar à destruição gradativa da placa ungueal das mãos e dos pés e de atuar como fonte para lesões fúngicas mais difundidas na pele, uma vez que sua cura não se dá de forma espontânea (SEEBACHER *et al.*, 2007).

Tal onicopatía é responsável por aproximadamente 50% de todas as doenças das unhas, sendo transmitida por contato direto, isto é, inter-humano, ou de forma indireta, através de vestuários, roupas de cama, calçados e utensílios contaminados com propágulos fúngicos que podem ser originados do solo, liberados juntos com pêlos ou material de descamação da pele. Além disso, outros fatores como um trauma ungueal, idade avançada, sistema imunológico comprometido, diabetes *mellitus*, má circulação periférica, *tinea pedis* e a exposição a áreas úmidas, também estão associados à onicomicose (MÜGGE; HAUSTEIN; NENOFF, 2006; LIMA; RÊGO; MONTENEGRO, 2007; HART; FEHRENBACHER, 2014).

Dados epidemiológicos atualizados referentes à frequência de onicomicoses a nível mundial e de Brasil, principalmente no Norte e Nordeste do país, acabam sendo bastante escassos.

Um estudo de revisão sistemática de Sigurgeirsson e Baran (2014) analisou a prevalência mundial de onicomicoses a partir de estudos baseados na população em geral e em pacientes hospitalares entre os anos de 1969 a 2013. O estudo indicou que os dermatófitos foram os agentes mais frequentes, sendo o *Trichophyton rubrum* o agente etiológico mais prevalente (45,0% dos casos), seguido pelas leveduras e pelos fungos não dermatofíticos. A pesquisa verificou ainda que as leveduras foram mais frequentes em países tropicais. Os dados referentes a este estudo encontram-se expostos no Quadro 1.1.

Outro estudo que reforça essa estatística e que também compõe o Quadro 1.1 é o de Gupta, Versteeg e Shear (2017), onde, através de uma pesquisa bibliográfica no PubMed, selecionaram 8 estudos epidemiológicos publicados em 2016, a partir dos quais foi possível estimar a

prevalência dos agentes etiológicos de onicomicose mais reportados ao redor do mundo. Os países envolvidos nesses estudos foram Brasil, Canadá, Estados Unidos, Grécia, Índia, Inglaterra e Sérvia. *T. rubrum* foi o agente mais encontrado na maioria dos países, enquanto a *Candida albicans* foi reportada apenas na Sérvia, Brasil, Canadá, Grécia e Índia. Outras espécies de dermatófitos também se mostraram prevalentes.

**Quadro 1.1.** Incidência dos agentes etiológicos mais reportados como causadores de onicomicoses no mundo.

País	Agentes etiológicos mais reportados	Autor
Mundial	<i>Trichophyton rubrum</i> (45,0%)	Sigurgeirsson e Baran, 2014
Brasil	<i>Trichophyton rubrum</i> . (57,8%)	Chiacchio <i>et al.</i> , 2013
	<i>Trichophyton</i> spp. (42,9%)	Silva-Rocha, de Azevedo e Chaves, 2016
Canadá	Dermatófitos (71,9%)	Gupta, A. K. <i>et al.</i> , 2016
Estados Unidos	<i>Trichophyton rubrum</i> (91,3%)	Totri <i>et al.</i> , 2017
Grécia	Dermatófitos (56,3%)	Maraki e Mavromanolaki, 2016
Índia	Dermatófitos (49,6%)	Gupta, C. <i>et al.</i> , 2016
Inglaterra	<i>Trichophyton rubrum</i> (91,5%)	Wlodek <i>et al.</i> , 2016
Sérvia	<i>Candida albicans</i> (36,59%)	Otašević <i>et al.</i> , 2016
Sérvia	<i>Trichophyton rubrum</i> (85,98%)	Dubljanin <i>et al.</i> , 2016

**Fontes:** Gupta *et al.*, 2017, com adaptações; Sigurgeirsson e Baran, 2014.

Em relação ao Brasil, alguns estudos revelam dados sobre a prevalência das onicomicoses e de seus agentes causadores pela extensão do território brasileiro. Chiacchio e colaboradores (2013) realizaram o primeiro estudo epidemiológico sobre onicomicose de ampla cobertura no país, envolvendo indivíduos com suspeita da doença e que foram atendidos por 38 especialistas diferentes, em consultórios dermatológicos de várias regiões do país, no período de maio a julho de 2010. Nesse estudo, evidenciou-se que o fungo *T. rubrum* foi o agente etiológico mais incidente, identificado em 57,8% das culturas.

Dentre as cinco regiões brasileiras, o Sul e o Sudeste foram as que apresentaram maior número de publicações sobre dados epidemiológicos de onicomicose.

No Sul do país, o *T. rubrum* tem sido o agente etiológico mais isolado, com uma frequência que vai de 28,5% a 89,4% dos casos de onicomicose. Somente em Maringá, estado do Paraná, foi reportada maior incidência da doença por leveduras (SANTOS *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 1999; MARTELOZO, GUILHERMETTI; SVIDZINSKI, 2005; AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007; AZAMBUJA *et al.*, 2014; HEIDRICH *et al.*, 2015).

No Sudeste, o agente mais frequente também foi o *T. rubrum*, com prevalência na faixa de 29,91% a 67% dos casos reportados da doença. O segundo agente mais frequente foi a *C. albicans*, sendo mais detectada na capital paulista (18,3%) e em São Bernardo do Campo (42,4%) (ARAÚJO *et al.*, 2003; CHINELLI *et al.*, 2003; GODOY-MARTINEZ *et al.*, 2009; PELEGRINI *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2015).

No Centro-oeste, foram encontrados dois estudos epidemiológicos que indicaram uma alta frequência de onicomicoses por *C. albicans* (71,4%) em pacientes residentes na cidade de Goiânia e, em contrapartida, uma maior incidência do dermatófito *T. rubrum* (41,2%) em Cuiabá, Mato Grosso (SOUZA *et al.*, 2009; LEITE JR *et al.*, 2014).

No Norte, a levedura *C. albicans* teve um maior impacto estatístico em Manaus e em Teresina, apresentando prevalência em 66,67% e 28,6% dos casos referidos da doença, respectivamente. Além disso, *T. rubrum* foi o segundo agente etiológico mais detectado em Manaus, atingindo 20% das unhas infectadas (OLIVEIRA *et al.*, 2006; MOBIN *et al.*, 2018; TIAGO; CORTEZ; OLIVEIRA, 2018).

O Nordeste, por sua vez, teve a sua população mais frequentemente afetada nos casos de onicomicoses pelo dermatófito *T. rubrum* (50,0%), mas a levedura *C. albicans* também se mostrou presente em muitos indivíduos (30,51%) (BRILHANTE *et al.*, 2005; MATOS; MARIANO, 2009).

A Tabela 1.1 elenca as espécies fúngicas mais relatadas na literatura como agentes etiológicos de onicomicose em cidades das regiões brasileiras.

**Tabela 1.1.** Incidência dos agentes etiológicos mais reportados como causadores de onicomicoses em cidades distribuídas pelas cinco regiões do Brasil.

Local/Região	Agentes etiológicos mais reportados	Autor
Florianópolis/Sul	<i>Trichophyton rubrum</i> (41%)	Santos <i>et al.</i> , 1997
Santa Maria/Sul	<i>Trichophyton rubrum</i> (50,3%)	Lopes <i>et al.</i> , 1999
Maringá/Sul	Leveduras (52,10%)	Martelozo, Guilhermetti e Svidzinski, 2005
Rio Grande/Sul	<i>Trichophyton rubrum</i> (89,4%)	Azambuja <i>et al.</i> , 2014
Porto Alegre/Sul	<i>Trichophyton rubrum</i> (28,5%)	Aquino, Constante e Bakos, 2007
	<i>Trichophyton rubrum</i> (60,25%)	Heidrich <i>et al.</i> , 2015
Rio de Janeiro/Sudeste	<i>Trichophyton rubrum</i> (29,91%)	Araújo <i>et al.</i> , 2003
São Bernado do Campo/Sudeste	<i>Candida albicans</i> (42,4%)	Pelegri <i>et al.</i> , 2009
São Paulo/Sudeste	<i>Trichophyton rubrum</i> (67%)	Chinelli <i>et al.</i> , 2003
	<i>Trichophyton rubrum</i> (33,2%)	Godoy-Martinez <i>et al.</i> , 2009
	<i>Trichophyton rubrum</i> (55,7%)	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
Goiânia/Centro-Oeste	<i>Candida albicans</i> (38,4%)	Souza <i>et al.</i> , 2009
Cuiabá/Centro-Oeste	<i>Trichophyton rubrum</i> (41,2%)	Leite Jr <i>et al.</i> , 2014
Manaus/Norte	<i>Candida albicans</i> (66,67%)	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
	<i>Trichophyton rubrum</i> (20%)	Tiago, Cortez e Oliveira, 2018
Teresina/Norte	<i>Candida albicans</i> (28,6%)	Mobin <i>et al.</i> , 2018
Fortaleza/Nordeste	<i>Candida albicans</i> (30,51%)	Brilhante <i>et al.</i> , 2005
Itabuna/Nordeste	<i>Trichophyton rubrum</i> (50%)	Matos e Mariano, 2009

Portanto, há três grupos de fungos bem estabelecidos como principais agentes etiológicos da onicomicose: os dermatófitos, as leveduras e os fungos filamentosos não-dermatófitos (ZANARDI *et al.*, 2008). Embora a literatura demonstre que a incidência de novos casos por fungos oportunistas emergentes, tanto leveduras quanto fungos filamentosos não-dermatofílicos, tenha aumentado estatisticamente nos últimos anos, o *T. rubrum* e a *C. albicans*

permanecem sendo os principais fungos responsáveis por esta patologia, tanto mundialmente, como nacionalmente e, por conta disto, estes dois agentes foram escolhidos como objetos de estudo do presente trabalho.

#### 1.1.1.1 *Trichophyton rubrum*

O termo dermatófitos é utilizado para designar um grupo de fungos taxonomicamente relacionados que infectam o tecido queratinoso e são capazes de ocasionar as dermatofitoses (*tineas*), infecções originadas pela invasão dos dermatófitos nas unhas, cabelos e extrato córneo da pele. Este grupo de fungos compreende diversas espécies que se encontram agrupadas em três gêneros principais: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (GHANNOUM; ISHAM, 2009; LEVINSON, 2010).

O *T. rubrum* é um fungo dermatófito antropofílico e cosmopolita, que pertencem ao gênero *Trichophyton*, e é o mais comum e amplamente distribuído agente causador de dermatofitoses humanas, mais especificamente *tinea unguium* (unhas), *tinea cruris* (virilhas), *tinea corporis* (pele glabra do corpo) e *tinea pedis* (pés) e muito raramente a *tinea capitis* (couro cabeludo). Em torno de 90% dos casos de dermatofitoses são causados por este fungo, além de ser isolado em cerca de 70% das onicomicoses. Sua transmissão é exclusivamente inter-humana ou por fômites contaminados (SIMPANYA, 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004; SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008; AMEEN, 2010; DRAKENSJÖ; CHRYSANTHOU, 2011).

A literatura indica que o *T. rubrum* é responsável pela maioria dos casos de dermatofitose crônica e recorrente (PEREIRA; MENDES; LIMA, 2013). Sidrim e Rocha (2004) atribuíram esse fato à sua adaptação ao hospedeiro humano, uma vez que este fungo consegue burlar as defesas inatas do organismo do hospedeiro e permanecer como infecção residual, com exarcebações clínicas e eventuais.

*T. rubrum* está envolvido na maioria dos casos de *tinea unguium*, que é uma forma de onicomicose ou infecção fúngica das unhas e, particularmente, as unhas dos pés são as mais difíceis de tratar (WAGNER; SOHNLE, 1995). O comprometimento da unha infectada por *T. rubrum* dá-se, na maioria das vezes, na forma subungueal distal e lateral (OSDL), um tipo de invasão da porção inferior da placa ungueal, onde ocorre um espessamento da unha, com hiperqueratose (excesso de produção de queratina), e formação de material que torna a placa amarelo-esbranquiçada e friável, podendo evoluir para uma distrofia parcial ou total da unha, estágio mais grave da onicomicose

A DLSO também pode estar associada à pigmentação negra da unha (melanoníquia fúngica), quando o patógeno envolvido é uma variante melanóide do *T. rubrum* ou de outros fungos que produzem melanina (BALLESTÉ; MOUSQUÉS, GEZUELE, 2003; LIMA; RÊGO; MONTENEGRO, 2007; PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015).

### **1.1.1.2 *Candida albicans***

Leveduras são componentes da microbiota normal de mucosas, pele e anexos de seres humanos e animais, que até pouco tempo eram vistas apenas como contaminantes, sem importância clínica, mas que, atualmente, são responsáveis por um número expressivo de casos de infecções fúngicas, com destaque para as onicomicoses (SIDRIM; ROCHA, 2004; SOUZA *et al.*, 2007).

Várias espécies de *Candida*, principalmente a *C. albicans*, são comensais humanos onipresentes, que se tornam patogênicos em situações onde a resistência do hospedeiro à infecção é reduzida, local ou sistemicamente. Nessas circunstâncias, este fungo pode causar doença em praticamente todas as localizações do corpo humano, resultando em infecção superficial, localmente invasiva ou disseminada (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2009), com as seguintes manifestações clínicas: paroníquia crônica com distrofia ungueal secundária, infecção ungueal distal, candidíase mucocutânea crônica (CMC) e candidíase secundária (ROBERTS; TAYLOR; BOYLE, 2003).

A invasão da placa ungueal pela *C. albicans* corresponde à cerca de 70% das onicomicoses provocadas por leveduras, resultando basicamente na inflamação da pele ao redor das unhas, com descoloração amarelo-esbranquiçada e com uma estrutura ondulada das placas ungueais afetadas (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009), e sucessivas recidivas podem evoluir para CMC, uma infecção severa da unha, com acentuado engrossamento, distorção e fragmentação da placa ungueal, com inchaço crônico da falange distal e, por isso, de difícil tratamento (BARBEDO; SGARBI, 2010).

### **1.1.1.3 Tratamento**

A onicomicose é a micose superficial mais difícil de tratar por ser uma infecção crônica, de erradicação laboriosa e com grande propensão a recidivas. Nessa doença, as unhas afetadas

possuem uma aparência desagradável, apresentando-se descoloridas, espessas e distróficas, impactando negativamente na vida social do paciente. Por conta disso, para um tratamento bem-sucedido, há fatores imprescindíveis a serem estudados, como: o aspecto clínico sugestivo de tal lesão; o diagnóstico micológico, baseado no exame direto, no cultivo e na identificação do agente causador; e a adesão do paciente ao tratamento (ARAÚJO *et al.*, 2003; SHIVAKUMAR *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2015).

Antigamente, o tratamento para esta patologia era realizado através da extração cirúrgica da unha doente, um método extremamente doloroso e traumático. Atualmente, são empregados três tipos de procedimentos: a administração de antifúngicos de uso tópico, orais (sistêmicos) ou a associação de ambos (SHIVAKUMAR *et al.*, 2010).

A seleção do antifúngico é determinada conforme a extensão e gravidade da infecção, pela espécie fúngica identificada como agente etiológico, bem como pela eficácia, efeitos colaterais e interações medicamentosas do medicamento, além da presença de doenças, condições comórbidas do paciente e sucesso ou fracasso de tratamentos anteriores (MEIS; VERWEIJ, 2001; ROSEN; STEIN GOLD, 2016; CHRISTENSON *et al.*, 2018).

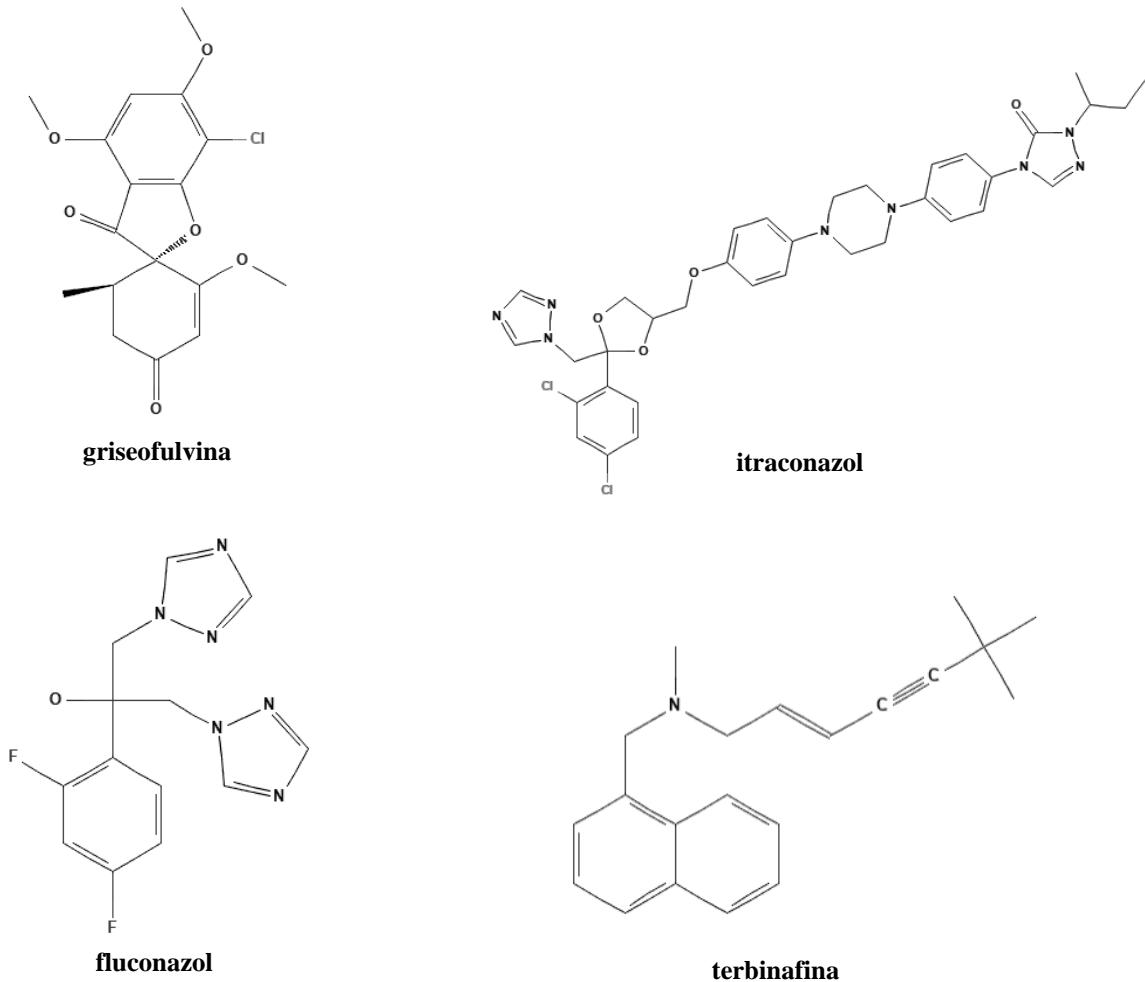
A terapia sistêmica está indicada nos casos em que há o acometimento da matriz ungueal, além daqueles em que múltiplas unhas são acometidas, e/ou quando há acometimento superior a 50% da placa ungueal. Apesar de ser mais cara e apresentar riscos de interações medicamentosas e efeitos colaterais, essa ainda é considerada a opção mais efetiva (LECHA *et al.*, 2005; STEINER; GASQUES; GATTI, 2014).

Nas infecções causadas por dermatófitos, a resposta ao tratamento tópico geralmente é fraca, exigindo o uso prolongado de um agente antifúngico por via oral, sendo que os principais fármacos utilizados são: griseofulvina, itraconazol, fluconazol ou terbinafina (Figura 1.1). Já no caso das infecções causadas por *Candida* spp., fluconazol, itraconazol e terbinafina são os fármacos mais empregados (WAGNER; SOHNLE, 1995; LECHA *et al.*, 2005; PARISER; JELLINEK; RICH, 2015; HAY, 2018).

O tratamento tópico da onicomicose, por sua vez, é indicado nos casos em que a matriz ungueal não está comprometida, quando existir contra-indicação no tratamento sistêmico e na profilaxia pós-tratamento. A formulação ideal precisa penetrar efetivamente no tecido ungueal e atingir altas concentrações na lâmina da unha. A vantagem desta via de administração está na



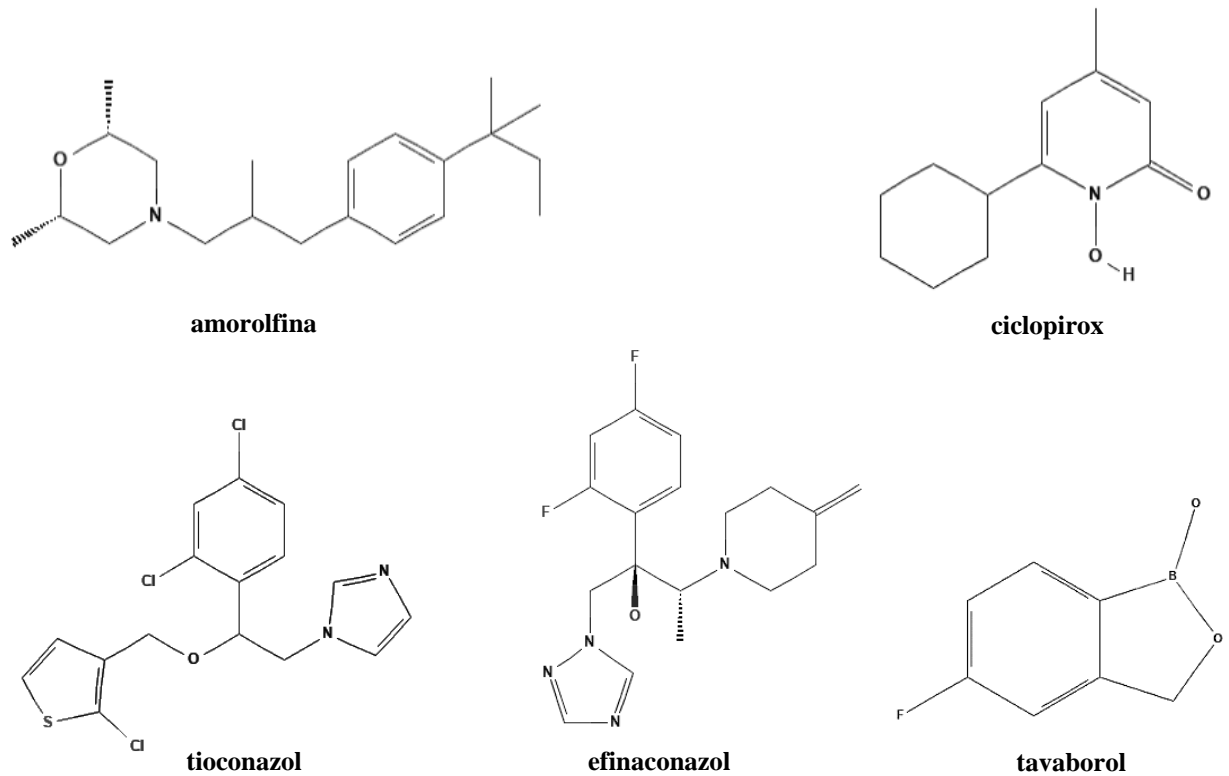
baixa ocorrência de efeito sistêmico, de interação medicamentosa e reações adversas (RUIZ; CHIACCIO, 2004; LECHA, 2005).



**Figura 1.1.** Estruturas químicas dos principais antifúngicos usados em tratamentos sistêmicos de onicomicoses. **Fonte:** PubChem, 2018.

No tratamento tópico, os antifúngicos que se destacam por ter um amplo espectro de ação contra dermatófitos e *Candida* spp., são os esmaltes de ciclopirox e amorolfina (Figura 1.2). Os derivados azólicos na forma de cremes ou soluções também são bastante empregados, como, por exemplo, tioconazol, além de efinaconazol e tavaborol, dois novos fármacos que vem sendo utilizados no tratamento das infecções por *T. rubrum*. Os antissépticos, como tintura de iodo, violeta de genciana, ácidos salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes e quinonas, também têm sido amplamente utilizados na terapia antimicótica (RUIZ; CHIACCIO, 2004; LIMA *et al.*, 2006; JELLINEK; RICH; PARISER, 2015).

O uso exclusivo da medicação tópica não tem sido eficaz na maioria dos casos, conseguindo apenas curar aqueles em que até um terço da unha encontra-se acometida. Assim sendo, a terapia combinada é considerada a intervenção de escolha para as onicomicoses, pois consiste na associação de medicamentos tópicos e orais, o que pode melhorar as taxas de cura ainda mais ou, eventualmente, encurtar a duração da terapia com o agente sistêmico (ROBERTS, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004).



**Figura 1.2.** Estruturas químicas dos principais antifúngicos usados em tratamentos tópicos de onicomicoses.  
**Fonte:** PubChem, 2018.

Apesar da busca incessante por novos fármacos que sejam mais eficientes no tratamento das onicomicoses, a baixa taxa de cura e a alta taxa de reinfecções é uma problemática a ser vencida, tendo em vista que a terapêutica medicamentosa fica comprometida por diversos fatores, como: carga elevada de fungos sobre a unha, agentes etiológicos multirresistentes, imunodeficiência, predisposição de pacientes com diabetes *mellitus* ou doença vascular periférica, bem como problemas de natureza farmacológica associados à capacidade de penetração e à porcentagem de retenção do antifúngico na unha, além da própria dureza e impermeabilidade das unhas que dificultam a penetração dos fármacos na queratina ungueal (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2010; SURENDER; RENU; ASHIMA, 2016).

Ademais, o crescimento da unha é lento (uma média de 3 mm por mês) e, ainda que o tratamento elimine o organismo infectante, o aspecto das unhas afetadas não melhora até que a placa ungueal cresça; logo, a terapia das onicomicoses costuma durar em torno de seis meses para as unhas das mãos e pode chegar a até dezoito meses para as unhas dos pés. Com isso, a longa duração para a constatação dos efeitos positivos do tratamento e o seu alto custo são condições que, muitas vezes, corroboram para a não adesão ou desistência dos pacientes (MISHRA *et al.*, 2005; QUELLER; BHATIA, 2015).

Por estes motivos, os pacientes muitas vezes acabam optando por alternativas terapêuticas empíricas que sejam menos dispendiosas e mais acessíveis, recorrendo ao conhecimento popular de preparações caseiras. Remédios que utilizam desde plantas, como folhas de hortelã, óleos essenciais de tomilho, de lavanda e da árvore do chá, até elementos comumente empregados na culinária, como vinagre de maçã, azeite de oliva, óleo de orégano, limão, alho, e até mesmo medicamentos como clorexidina, Vick vaporub<sup>®</sup>, Lakezia<sup>®</sup> e mistura de bicarbonato de sódio com água oxigenada em seus preparos. Estes tratamentos são utilizados de maneira tópica, como pastas, esmaltes e banhos de pés ou mãos.

Diante deste cenário, o estudo de produtos naturais bioativos constitui não somente uma necessidade de bioprospecção, mas primordialmente contribui para o conhecimento de novos compostos químicos bioativos, que podem ser usados como protótipos para a descoberta de novos fármacos antifúngicos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

### **1.1.2 Óleos essenciais**

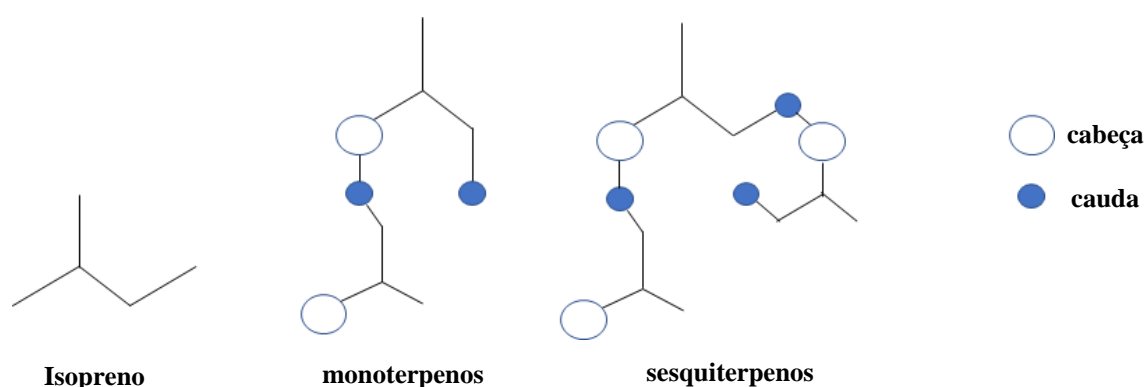
Entende-se por produtos aromáticos aqueles que têm como característica primordial odor ou sabor inerente, sem levar em consideração sua qualidade comercial ou estética. As plantas aromáticas são definidas como aquelas que podem gerar, por algum processo físico-químico, um produto aromático (BANDONI, 2008). Estas plantas são capazes de sintetizar, durante seu metabolismo secundário, compostos naturais, voláteis, complexos e de forte odor, os chamados óleos essenciais (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).

Os óleos essenciais são armazenados nos órgãos das plantas aromáticas, em estruturas secretoras especializadas e estão associados às funções primordiais de atração de insetos polinizadores e defesa contra pragas ou predadores, que permitem à planta controlar e regular seu ambiente, garantindo a sobrevivência do vegetal em seu ecossistema. As estruturas

secretoras podem ser externas (tricomias glandulares) ou internas (células parenquimáticas diferenciadas, bolsas esquizógenas ou lisígenas e canais oleíferos) e costumam estar presentes nas flores, folhas, rizomas, córtex, brotos, bulbos, sementes, madeiras, cascas, raízes e frutos das plantas, sendo que o farmacógeno utilizado pode interferir na concentração e composição do óleo (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; BIASI; DESCHAMPS, 2009; DHIFI *et al.*, 2016).

Quanto à composição química dos óleos essenciais, esses são constituídos por misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas que geralmente são obtidas por hidrodestilação e arraste a vapor, mas também por extração de solventes. Além disso, sua estrutura química é basicamente formada por carbono, hidrogênio e oxigênio, a qual dá origem à uma variada mistura de substâncias, podendo haver inúmeras centenas delas, com predominância de uma a três substâncias principais (compostos majoritários) que caracterizam a espécie vegetal que as produzem (SIMÕES *et al.*, 2003; WOLFFENBÜTTEL, 2007; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Em sua maioria, esses constituintes majoritários são os derivados de terpenóides, cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno ( $C_5H_8$ ) e cujos esqueletos carbonados são formados pela condensação de várias unidades pentacarbonadas (unidades isoprênicas), ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda”, como demonstrado na Figura 1.3. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (em torno de 90% dos óleos), cuja estrutura é formada por duas unidades condensadas de isopreno, e os sesquiterpenos, que possui três unidades (SIMÕES *et al.*, 2003).



**Figura 1.3.** Ilustração das estruturas químicas dos compostos isopreno, mono- e sesquiterpenóides, e da conformação cabeça-a-cauda. **Fonte:** Simões *et al.*, 2003.

Os terpenóides podem apresentar funções químicas diversas, como ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis ou epóxidos terpênicos, dentre outras, as quais propiciam características aromáticas e diversas ações biológicas aos óleos essenciais (BURT, 2004; FELIPE; BICAS, 2017; MOGHADDAM; MEHDIZADEH, 2017).

A volatilidade do óleo essencial é, sem dúvida, sua característica primordial, que inclusive permite diferenciá-lo dos óleos fixos, cuja composição consiste numa mistura de substâncias lipídicas. Geralmente detém um aroma agradável e intenso, mas há aqueles cujo aroma é desagradável e até mesmo inodoro. Além disso, enquanto os óleos essenciais são pouco ou nada miscíveis em água, demonstram grande capacidade de solubilidade em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos (inclusive os apolares). Contudo, costumam ser óleos pouco estáveis, uma vez que sua estabilidade é comprometida por fatores como a presença de ar, luz, temperatura, umidade e metais (COSTA, 1986; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais são amplamente utilizados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, sendo empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em formulações farmacêuticas, comercializados na sua forma bruta ou beneficiada (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A seguir, serão apresentadas as oito espécies de plantas que foram estudadas nesse trabalho.

#### **1.1.2.1 Gênero *Aniba* Aubl.**

A família Lauraceae possui distribuição pantropical e tem grande representatividade na América, Ásia Tropical, Austrália e Madagascar, mas é pouco incidente no sul da África. Possui cerca de 3.000 espécies que abrangem 52 gêneros. Nas Américas, ocorrem em torno de 30 gêneros e 1.000 espécies de Lauraceae com ampla diversidade na América do Sul e Central. O Brasil alberga 24 gêneros e cerca de 400 espécies de Lauraceae, sendo esta uma das famílias de maior relevância na composição florística de grande parte dos ecossistemas florestais na Amazônia e Mata Atlântica (ALVES *et al.*, 2018; QUINET, 2008; SOUZA; LORENZI, 2012).

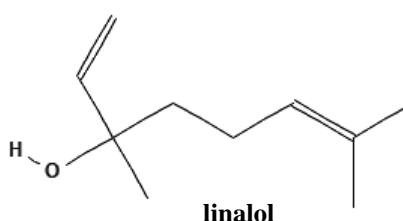
Dentro desta família, há inúmeras espécies ricas em substâncias aromáticas e a maioria tem importância econômica (madeira, óleos essenciais e frutos comestíveis) e/ou

fitossociológica, devido à sua grande representatividade e ampla distribuição (OLIVEIRA; CALLADO; MARQUETE, 2001). Além disso, encontram-se espécies do gênero *Aniba*, as quais já demonstraram ser de grande importância para aplicação medicinal, uma vez que se tem constatado diversas atividades relacionadas a partes de suas plantas e seus óleos essenciais, com, por exemplo, atividades antibacteriana, antifúngica (MOREIRA *et al.*, 2007; RAGGI, 2008), antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2007) e antiparasitária (SILVA *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foram estudadas 3 espécies do gênero *Aniba*: *A. parviflora*, *A. rosaeodora* e *A. canelilla*.

#### 1.1.2.1.1 *Aniba parviflora* (Meisn) Mez.

*A. parviflora* (Meisn.) Mez, também conhecida como macacaporanga, louro-rosa e louro-precioso, é uma árvore de porte pequeno nativa da Amazônia (Figura 1.4) que se distribui nas matas de terra firme dos estados do Acre, Amazonas, Amapá e Pará. A planta pertence à família Lauraceae e tem como sinônimas *Aniba fragrans* Ducke e *Aydendron parviflora* Meisn. (CORRÊA, 1984a; FELSEMBURGH; PELEJA; DO CARMO, 2016; FRANCISCO; MIRANDA, 2018).



**Figura 1.4.** Árvore da planta *A. parviflora* e a estrutura química do linalol.  
**Fontes:** Batista, 2014; PubChem, 2018.

A espécie é aromática, destacando-se pela produção de óleo essencial, cujo componente principal é o linalol (Figura 1.4), produto químico que pode ser transformado em vários derivados de valor agregado para a indústria de fragrâncias. Em decorrência disto, tem sido vista como uma substituta em potencial ao pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), que é uma

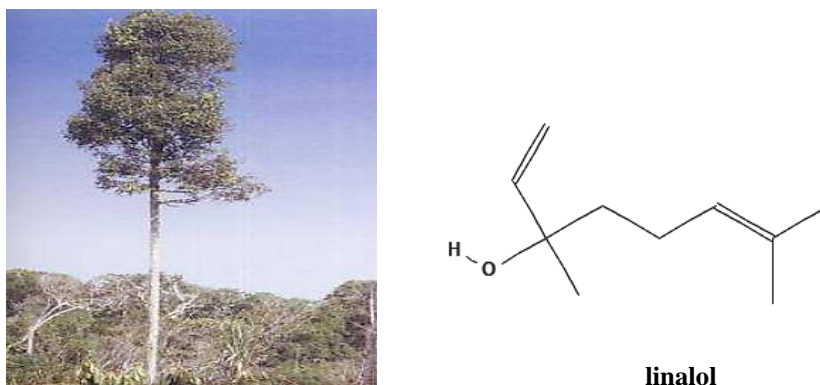
espécie em perigo de extinção (MAIA; ANDRADE, 2009; FELSEMBURGH; PELEJA; CARMO, 2016).

*A. parviflora* costuma ser confundida com o pau-rosa devido à semelhança das folhas e flores, mas apresenta aroma diferenciado, tanto no tronco como nas folhas; a sua madeira possui aroma de rosa e cor amarelada, sendo muito aplicada em marcenaria e carpintaria. A casca desta planta é comercializada no mercado Ver-O-Peso, em Belém-PA, e sua infusão é usada nos tradicionais banhos-de-cheiro, comuns na época dos festejos de São João (CORRÊA; 1984b; MATTOSO, 2005). Os extratos das folhas e da casca são usados como chá, tintura e cataplasmas para tratar envenenamento por picadas de cobra em comunidades da Amazônia brasileira (DE MOURA *et al.*, 2018).

O composto majoritário linalol (cerca de 30-50%) (MAIA; ANDRADE, 2009), presente nos óleos essenciais de *A. parviflora* tem se mostrado o agente responsável por suas atividades anti-inflamatória e analgésica (PEANA *et al.*, 2002, 2003), antimicrobiana, antioxidante, antitumoral (SARRAZIN *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2016) e demonstrou atividade contra o veneno da cobra *Bothrops atrox* (DE MOURA *et al.*, 2018). A literatura também evidencia que o linalol é um eficiente larvicida (PEREIRA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014).

#### **1.1.2.1.2 *Aniba rosaeodora* Ducke**

*A. rosaeodora* é uma árvore de grande porte (Figura 1.5), mais conhecida popularmente como pau-rosa, mas também como pau-rosa mulatinho, pau-rosa-itaúba, pau-rosa-imbaúba, pau-de-fuso e jacarandá-rosa e, internacionalmente, como rosewood, tulipwood, pinkwood e bois-de-rose e bois de rose femelle (França). Ocorre nos países que compõem a região amazônica e no sul da América Central, em florestas de terra firme e várzea, sendo frequentemente encontrada no sul do estado do Amazonas e estendendo-se pelos estados do Amapá e Pará. As sinónimas consideradas para a espécie são: *Aniba rosaeodora* var. *amazonica* Ducke e *Aniba duckei* Kosterm (CORRÊA, 1984b; BORRÁS, 2003; OHASHI; ROSA, 2004; CARRERO *et al.*, 2014).



**Figura 1.5.** Árvore da planta *A. rosaeodora* e estrutura química do linalol.  
**Fontes:** Lorenzi, 2013; PubChem, 2018.

Destaca-se na produção de óleo essencial de aroma agradável, rico em linalol, substância de grande valor econômico para a região amazônica, pois é muito utilizada como fixador de perfumes e na indústria de cosméticos. O teor de linalol varia entre 38,48% a 89,4%. O óleo é obtido a partir da destilação de qualquer parte da planta, porém a madeira tem sido sua fonte principal, além de também ser utilizada como matéria-prima de móveis (BORRÁS, 2003; OHASHI; ROSA, 2004; SOUZA; LORENZI; 2012; ZOGHBI *et al.*, 2015; TELES; MOUCHREK FILHO; SOUZA, 2017).

Possui ainda ampla aplicação na medicina popular para cuidados com a pele e para amenizar: dor de dentes (após a extração), acnes, resfriados, tosse, dermatites, febres, reumatismo, artrite, dores nas articulações, dor de cabeça, infecções diversas e ferimentos, tensão nervosa e náusea (BORRÁS, 2003; LORENZI; MATOS, 2008).

A presença do linalol confere inúmeras atividades biológicas ao óleo essencial da *A. rosaeodora*, como atividade antifúngica (PAWAR; THAKER, 2006), ação antitumoral (SOEUR *et al.*, 2011) e acaricida (KIM; KIM; AHN, 2003; KIM *et al.*, 2004), inibição sobre adenilato ciclase na retina (SAMPAIO *et al.*, 2012), atividade antibacteriana (SARRAZIN *et al.*, 2016), ação larvicida (TELES; MOUCHREK FILHO; SOUZA, 2017) e seu extrato etanólico demonstrou atividade antioxidante (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JR, 2012).

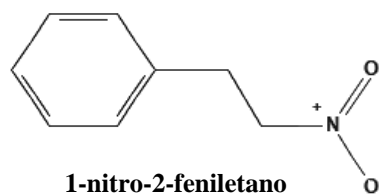
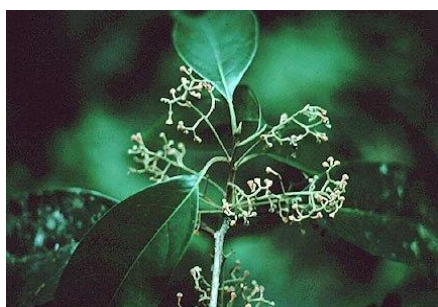


### 1.1.2.1.3 *Aniba canelilla* (Kunth) Mez.

*A. canelilla* é uma árvore de grande porte nativa da região Amazônica na floresta de terra firme, distribuindo-se amplamente nos estados do Amazonas e Pará, sendo abundante no Rio Negro. É popularmente conhecida como preciosa, canela, canela-cheirosa, casca-preciosa, casca-do-maranhão, folha-preciosa, pau-cheiroso, amapaima, pereforá, periroá e canela muena (Peru). Suas sinonímias botânicas são: *Aniba elliptica* A.C. Sm. e *Cryptocarya canelilla* Kunth (CORRÊA, 1984c; COSTA, 1990; LORENZI; MATOS, 2008) (Figura 1.6).

O óleo essencial de *A. canelilla* tem como composto majoritário o 1-nitro-2-feniletano (Figura 1.5), sendo que cada parte da planta contém um percentual desse composto (folhas: 71,2%; hastes finas do caule: 68,2%) (LIMA *et al.*, 2004), além do eugenol, metileugenol e safrol. O odor de canela deste constituinte distingue a espécie *A. canelilla* das demais, em toda a família Lauraceae (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960). A etnofarmacologia desta espécie tem demonstrando que a planta é muito empregada na forma de chá (infusão da casca e folhas), tintura e pó, e seus usos medicinais são os mais diversos, sendo muito reputada como estimulante digestivo, eupéptico, antiespasmódico e peitoral, carminativo, sendo também empregado para artrites, edemas nos pés, gota, hidropsia, expectoração crônica, sífilis, leucorréia, aerofagia, males do coração, esgotamento nervoso (calmante) e perda de memória (CORRÊA, 1984c; COSTA, 1990; DE LIMA *et al.*, 2009; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Estudos demonstram que o 1-nitro-2-feniletano é responsável por inúmeras atividades biológicas, tanto do óleo quanto de outros tipos de extratos da casca-preciosa, sendo elas: ação analgésica (DE LIMA *et al.*, 2009), inibição da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2014), ação antioxidante, potencial fotoprotor (MARTINS *et al.*, 2016), fungistática (OGER *et al.*, 1994), vasorrelaxante (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014), leishmanicida (SILVA *et al.*, 2009) e tripanocida (GIONGO *et al.*, 2017).

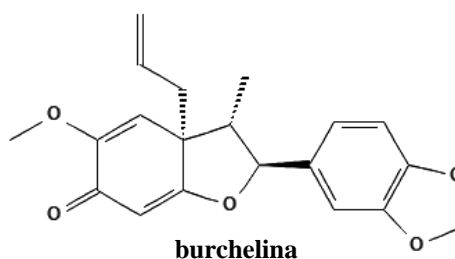
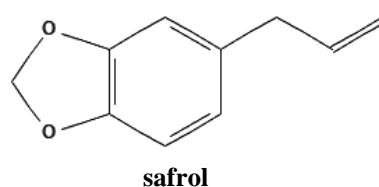


**Figura 1.6.** Folhas e flores da planta *A. canelilla* e estrutura química do 1-nitro-2-feniletano. **Fontes:** Useful Tropical Plants Database, 2018; PubChem, 2018.

### 1.1.2.2 *Ocotea cymbarum* H. B. Kunth

A espécie *O. cymbarum* (Figura 1.7) é uma árvore mediana, pertence à família Lauraceae, conhecida popularmente pelos nomes de louro-inhamuí, louro-mamori, pau-de-gasolina, safrás, óleo-de-nhamuí, inamuhy e sassafráz e suas sinónimas botânicas são: *Ocotea barcellensis* (Meisn.) Mez, *Nectandra barcellensis*, *Nectandra elaiophora*, *Acroclididium elaiophorum* e *Nectandra cymbarum*. A planta está amplamente distribuída pelo Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Venezuela, sendo que no Brasil, possui uma faixa restrita dentro da floresta inundada ao longo do rio Negro (BERG, 1982, BRASIL, 1992; CNCFLORA, 2012; WCMC, 1998).

As partes utilizadas para extração de óleo essencial dessa espécie são as cascas ou madeiras das árvores, de onde se obtém o safrol (cerca de 91,9%) (SHUKIS; WACHS, 1948), um de seus componentes principais e economicamente visado. Ele já foi muito empregado na indústria de alimentos, como aromatizante, mas caiu em desuso devido à sua toxicidade. Porém, pode ser utilizado em produtos como inseticidas e desinfetantes. A existência de outros compostos, como a burchelina, o alfa-selineno, o alfa-felandreno, o alfa- e o beta-pineno e o terpine-4-ol (NARCISO *et al.*, 2014), garantem ao óleo um aroma característico, que pode ser útil na confecção de essências e fragrâncias (PASTORE JR *et al.*, 2005).



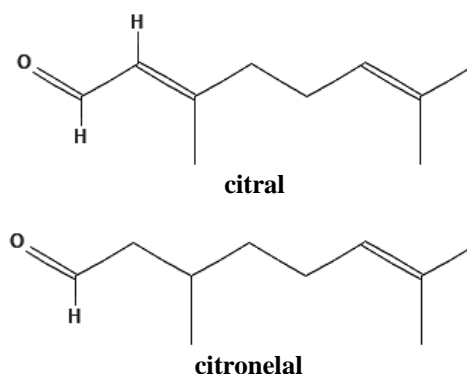
**Figura 1.7.** Árvore da planta *O. cymbarum* e estruturas químicas do safrol e da burchelina.  
Fontes: Marinho e Wittman, 2018; PubChem, 2018.

A planta *O. cymbarum*, por sua vez, costuma ter a resina oleosa de seu tronco empregada no uso popular como tratamento de afecções cutâneas, dermatoses e parasitoses,

principalmente do couro cabeludo (BERG, 1982). A neolignana burchelina foi isolada por Narciso e colaboradores (2014), que verificaram sua ação larvívica contra o *Aedes aegypti*.

### 1.1.2.3 *Melissa officinalis* L.

*M. officinalis* (Figura 1.8) é uma herbácea perene e arbustiva que pertence à família Lamiaceae, sendo originária do Oriente Médio e Mediterrâneo, sul da Europa e Ásia, mas amplamente cultivada em países de clima subtropical e temperado. No Brasil, tem ampla distribuição por quase todo o país e possui vários nomes populares, como: cidreira, erva-cidreira verdadeira, melissa, melissa-romana, cidrilha, melitéia, limonete, salva-limão, citronela-menor, erva-luísia, salva-do-brasil e chá-da-frança; internacionalmente é conhecida como lemon balm. Suas sinonímias botânicas são: *Faucibarba officinalis* (L.) Dulac, *Mutelia officinalis* (L.) Gren. ex Mutel, *Thymus melissa* E.H.L. Krause e *Melissa bicornis* Klovov (MARTINS, 1989; COSTA, 1990; CASTRO, CHEMALLE, 1995; RIBEIRO; DINIZ, 2008; LORENZI; MATOS, 2008; TROPICOS, 2016).



**Figura 1.8.** Folhas da planta *M. officinalis* e estruturas químicas do citral e do citronelal.  
**Fontes:** Shakeri, Amirhossein e Javadi, 2016; PubChem, 2018.

O chá de suas folhas e inflorescências e seu óleo essencial são popularmente usados como digestivo (alívio de azias e má digestão), antiespasmódico, sedativo e calmante para tratar casos de ansiedade, estresse e insônia, bem como transtornos de origem nervosa (cefaleias, vertigens, enxaquecas); o chá também é utilizado para tratar gripes e resfriados, e, externamente, em manifestações virais como o herpes labial (SEKEROGLU *et al.*, 2006; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010; LORENZI; MATOS, 2008).

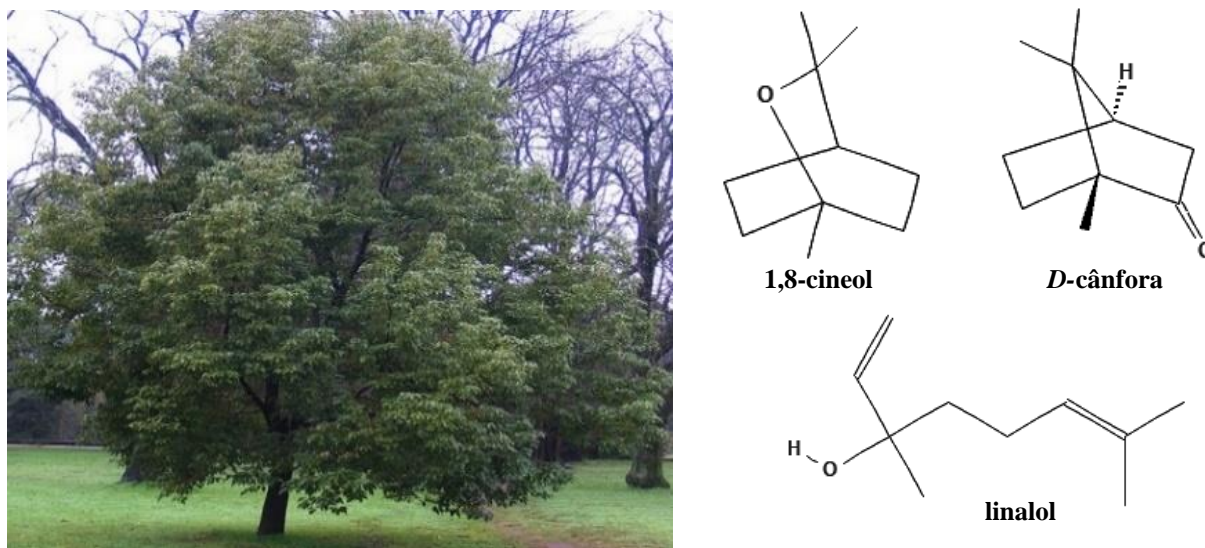
O óleo de *M. officinalis* é obtido de suas folhas, flores e raízes, sendo muito utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, e também na medicina popular como hipotensor e repelente para insetos. Pode apresentar toxicidade em pequenas doses, causando entorpecimento e bradicardia, ou causar parada cardíaca e respiratória em casos mais graves (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA, QUINTAS, 1998; RIBEIRO; DINIZ, 2008).

Os constituintes predominantes de seu óleo essencial são o citral (mistura de neral e geranial: 10-37%) e o citronelal (2-40%), mas também são encontradas outras substâncias como o citronelol, o limoneno, o linalol e o geraniol (KREIS; MOSANDL, 1994; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010; TAHERPOU *et al.*, 2012). Os teores de óleo essencial de melissa, obtidos por hidrodestilação, normalmente são significativamente baixos (0,02 a 0,40%), fato que lhe agrega um alto valor de mercado quando comparado aos preços do óleo essencial de rosas e de outras aromáticas, tornando-lhe uma classe preciosa de óleo essencial (LUZ *et al.*, 2014).

O extrato de *M. officinalis* possui atividades antioxidante (DASTMALCHI *et al.*, 2008) e inibitória na replicação do vírus *Herpes simplex* tipo 2 (MAZZANTI *et al.*, 2008), além de aliviar palpitações a condições de tensão, inquietação e irritabilidade (ALIJANIHA *et al.*, 2015). O óleo essencial da planta também possui atividade antioxidante, além de antitumoral (DE SOUSA *et al.*, 2004), antimicrobiana (ABDELLATIF *et al.*, 2014) e antifúngica (EL OUADI *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

#### 1.1.2.4 *Cinnamomum camphora* (L.) J. Pres

A espécie *C. camphora* é uma árvore de grande porte (Figura 1.9) que pertence à família Lauraceae e é oriunda da Ásia, particularmente das florestas montanhosas da China, da Ilha Formosa e das ilhas do Sul do Japão, porém encontra-se distribuída em vários países, inclusive no Brasil. Esta planta é popularmente conhecida como cânfora, canforeira e canela-canforeira. Suas sinônimas são: *Camphora camphora* (L.) H. Karst., *Camphora officinarum* Nees., *Cinnamomum nominale* (Hayata) Hayata, *Cinnamomum camphoroides* Hayata, *Camphora camphora* var. *nominale* Hayata, *Camphora simondii* Lecomte, *Laurus camphora* L., *Persea camphora* (L.) Spreng (COSTA, 1986; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; LORENZI *et al.*, 2003; FINTELMANN; WEISS, 2010).



**Figura 1.9.** Árvore da planta *C. camphora* e estruturas químicas dos principais componentes de seu óleo essencial: D-cânfora, linalol e 1,8-cineol. **Fontes:** Serralves, 2018; PubChem, 2018.

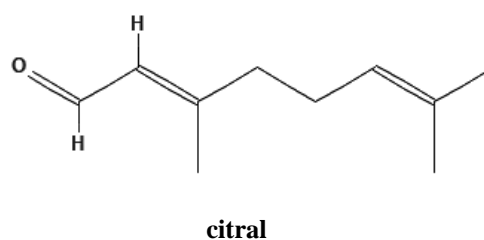
O óleo essencial da *C. camphora* pode ser obtido por destilação dos ramos lascados, tronco e madeira da árvore, ou das folhas e galhos e é a forma mais adequada de uso, porém não é recomendado para uso interno. Possui aplicação na medicina popular como anti-helmíntico, antirreumático, antiespasmódico, cardiotônico, carminativo, diaforético, sedativo e tônico. É usado no tratamento de dores articulares e musculares, como bálsamos para frieiras, lábios rachados, herpes labial, doenças de pele e como inalador para congestão brônquica, no tratamento de resfriados e doenças pulmonares. O uso excessivo pode causar vômitos, palpitações, convulsões e até morte; além disso, é possível que o óleo seja absorvido pela pele, causando intoxicação sistêmica. O óleo também é utilizado na aromaterapia para tratar queixas digestivas e depressão. Além disso, a infusão de madeiras e folhas da planta é usada como inalante no tratamento de resfriados e doenças dos pulmões (CHELLIAH, 2008).

A cânfora é um produto cristalino e natural presente em sulcos dos caules lenhosos e das raízes da *C. camphora*, mas é encontrada em maior proporção no óleo essência, cujos principais constituintes são a D-cânfora (28,1% - 51,3%), o linalol (12,8% - 22,9%) e o 1,8-cineol (4,3% - 11,3%), além de traços de borneol, canfeno, dipenteno, terpenol, linalol, eugenol e safrol. (COSTA, 1986; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; CHELLIAH, 2008; FINTELMANN; WEISS, 2010; SINGH; JAWAID, 2012; GUO *et al.*, 2016). Os compostos marjoritários estão representados na Figura 1.9.

Ao longo dos anos, esta espécie vem sendo amplamente estudada quanto às suas atividades biológicas. Extratos de diferentes partes da planta demonstraram ação anti-inflamatória e antioxidante (LEE *et al.*, 2006), atividade antifúngica (LI *et al.*, 2014) e antimicrobiana (CHEN; DAI, 2015). Outros estudos realizados com o óleo essencial da cânfora revelaram que ele possui propriedades fungistáticas (MISHRA *et al.*, 1991), ação repelente, inseticida e fumigante (LIU *et al.*, 2006; ROSZAINI *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014) e ação anestésica (PEDRAZZANI; NETO, 2014).

#### 1.1.2.5 *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf

*C. citratus* (Figura 1.10) é uma gramínea de porte herbáceo da família Poaceae, nativa do Sudeste asiático, principalmente da Índia, mas cultivada também em países tropicais e, apesar de não ser endêmica no Brasil, está bem aclimatada em quase todos os estados do país, onde é popularmente conhecida como capim-cidreira, capim-limão, capim-santo, capim-cidrão, capim-cidrilho, capim-catinga e capim-cheiroso, e ainda, internacionalmente como lemon grass. Duas de suas sinônimas botânicas são: *Andropogon citratus* (DC.) e *Cymbopogon nardus* subvar. *citratus* (DC.) Roberty (CARIBÉ; CAMPOS, 1991; BIASI; DESCHAMPS, 2009; PAIVA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; TROPICOS, 2017).



**Figura 1.10.** Folhas da planta *C. citratus* e estrutura química do citral. **Fontes:** Sorocaba, 2018; PubChem, 2018.

O óleo essencial desta espécie está presente em todas as partes da planta, porém, em maior teor nas suas partes aéreas (folhas). O principal constituinte do óleo é o citral (Figura 1.10), responsável pelo odor de limão (40-80% do total do óleo) e que, por isso, tem sido largamente empregado nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria, além de ser

utilizado como repelente e desinfetante (COSTA, 1986; MARTINS, 1989; MATOS, 1994; PAIVA *et al.*, 2009; GOMES, 2003; COSTA *et al.*, 2005; FARHANG *et al.*, 2013; ELHASSAN; ELTAYEB; KHALAFALLA, 2016). A medicina popular utiliza o chá das folhas da planta *C. citratus* como analgésico, calmante, antiespasmódico, antirreumático, antitussígeno e para tratar problemas estomacais (disfunções gástricas), bem como no alívio de pequenas crises de cólicas uterinas e intestinais (DI STASI *et al.*, 1989; MARTINS, 1989; CARIBÉ; CAMPOS, 1991; LORENZI; MATOS, 2008)

O óleo essencial do capim-limão possui atividades amplamente estudadas, que demonstram suas ações antimicrobiana (IRKIN; KORUKLUOGLU, 2009; BASSOLÉ *et al.*, 2011), anti-inflamatória, analgésica (GBENOU *et al.*, 2013), inseticida e repelente contra *A. aegypti* (CASTILLO; STASHENKO; DUQUE, 2017).

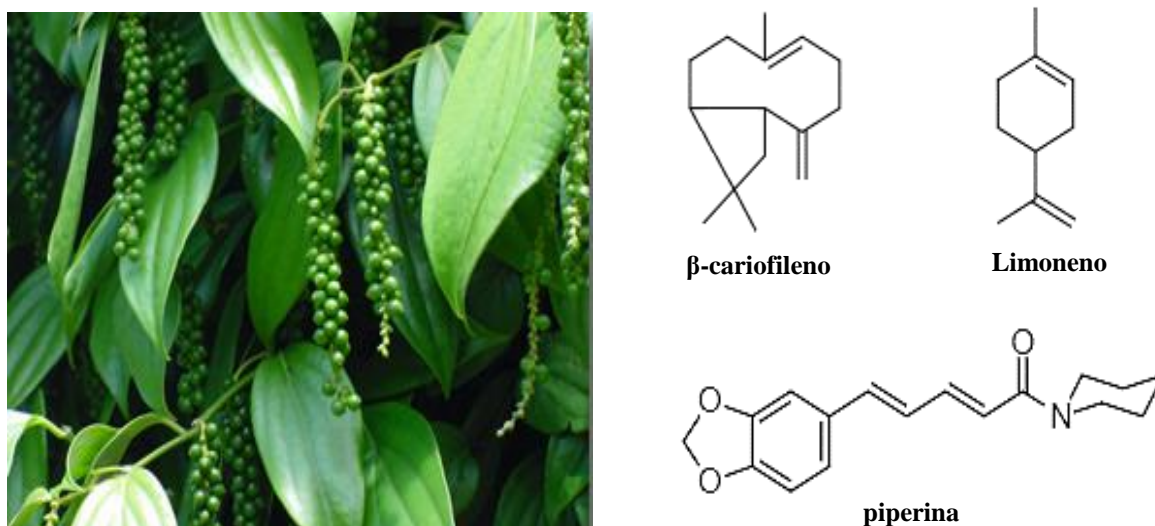
#### **1.1.2.6 *Piper nigrum* L.**

*Piper nigrum* L. é uma espécie perene, semi-lenhosa e trepadeira (Figura 1.11) pertencente à família Piperaceae, conhecida nacionalmente como pimenta-do-reino, pimenta preta, pimenta da Índia e internacionalmente como black pepper, Madagascar pepper, pepper e white pepper, sendo nativa das colinas do sudoeste da Índia, mas amplamente cultivada nas regiões quentes e úmidas do país, assim como na Sri Lanka e em outros países tropicais, inclusive no Brasil, principalmente no Pará (CORRÊA, 1984b; EMBRAPA, 2004; LORENZI; MATOS, 2008; FRLHT, 2016).

A pimenta-do-reino produzida na forma de grãos secos (preta e branca), verde em conserva e em pó, é utilizada como condimento e na elaboração de alimentos industrializados, além de ser adicionada a misturas afrodisíacas com mel, para tratamento de tosse e gripe, sendo conhecida com propriedades de fortalecimento, e a decoção de folhas e sementes é administrada para tratar diabetes. O óleo essencial da planta é utilizado em aromaterapia, nos casos de hepatopancreatite, laringite, odontalgias, má digestão e astenia sexual (SEKEROGLU *et al.*, 2006; LORENZI; MATOS, 2008; LINGARAJU; SUDARSHANA; RAJASHEKAR, 2013).

Nos grãos da planta encontram-se seus componentes químicos mais importantes: a piperina e o óleo essencial. A piperina confere a esta pimenta um tipo de pungência (ardor),

enquanto o óleo, presente de 0,6 a 2,6% da planta, lhe confere o aroma característico. Existem pelo menos outros 100 compostos variados presentes no óleo essencial, mas os principais são  $\beta$ -cariofileno (19,12% - 70,4%), limoneno (9,74% - 38,4%),  $\alpha$ -pineno (6,32% - 25,6%) e  $\beta$ -pineno (8,0% - 24,2%). A piperina e um outro subproduto, oleorresina, são extraídos de grãos chochos de pimenta e utilizados nas indústrias de embutidos, perfumaria e farmacêutica, cujos preços podem atingir até três vezes o valor obtido do produto comercializado na forma de grãos (PINO; AGÜERO; FONTES, 2003; ORAV *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2006; PARTHASARATHY *et al.*, 2007; BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014; OLIVEIRA; ALENCAR FILHO; VASCONCELLOS, 2014; MORSHED *et al.*, 2017).



**Figura 1.11.** Folhas e frutos da planta *P. nigrum* e estruturas químicas do  $\beta$ -cariofileno, do limoneno e da piperina. Fontes: Simões *et al.*, 2003; CEPLAC, 2018; PubChem, 2018.

As propriedades biológicas do óleo essencial de *P. nigrum* tem sido bastante estudadas e demonstram atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica (SINGH *et al.*, 2013; BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014; MORSY; EL-SALAM, 2017), anti-inflamatória, analgésica (JEENA *et al.*, 2014) e anticancerígena (MAJDALAWIEH; CARR, 2010).

Face à ampla gama da utilização dos óleos essenciais na medicina popular, e tendo em vista as evidências científicas de suas propriedades biológicas, tais atributos podem ser bem empregados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos fitoterápicos. Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antifúngica dos oito óleos essenciais anteriormente descritos a fim de desenvolver produtos direcionados ao tratamento tópico de onicomicoses ocasionadas pelos agentes etiológicos *C. albicans* e *T. rubrum*.



## 1.2 METODOLOGIA

### 1.2.1 Descrição das Amostras

As amostras de óleos essenciais utilizadas neste projeto foram adquiridas comercialmente, a saber: *A. rosaeodora*, *A. parviflora*, *A. canelilla*, *C. camphora*, *P. nigrum*, (HERBRAM<sup>®</sup>), *O. cymbarum* (PRB<sup>®</sup> – Produtos Regionais do Brasil Ltda), *M. officinalis* (QUINARI<sup>®</sup>) e *C. citratus* (Essências da Amazônia<sup>®</sup>).

Com relação aos microorganismos testados, foram cedidas cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *C. albicans* (ATCC 36232) e *T. rubrum* (ATCC 28189) pela Coleção de Microrganismos de interesse médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

### 1.2.2 Teste de susceptibilidade antifúngica (TSA)

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado no laboratório de Micologia do INPA, e consiste em avaliar a atividade antifúngica da substância teste frente ao microorganismo de interesse. Para tanto, foi utilizado como parâmetro do teste a Norma M27-A3 (CLSI, 2008), que descreve o Método de Referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica, estabelecida pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), e a Norma M38-A2 (CLSI, 2008) que padroniza o teste para fungos filamentosos.

#### 1.2.2.1 Preparo do inóculo

O cultivo dos microorganismos foi realizado em tubos contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans* e Ágar Batata Dextrose para *T. rubrum*. Posteriormente, os fungos foram incubados em estufa. *C. albicans* foi incubada por 24h à temperatura de 35°C, enquanto que o *T. rubrum* foi incubado à 28°C por cerca de 7 a 15 dias.

Após a semeadura dos fungos de interesse, foram preparados os seus respectivos inóculos, onde, com o auxílio de uma alça estéril de 10 µL, retirou-se uma alçada de colônias (*C. albicans*) ou fragmentos de cultura (*T. rubrum*) e depositou-se o material em 5 mL de solução salina estéril (8,5g.L<sup>-1</sup> NaCl; salina a 0,85%). Então, submeteu-se a suspensão resultante à agitação

em vórtex por 15 segundos. Feito isto, realizou-se contagem de células em câmara de Neubauer, para obtenção de uma suspensão-padrão contendo  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 1.2.2.2 Diluição das substâncias testes

As substâncias testadas neste estudo foram óleos essenciais e, por serem de origem vegetal, optou-se por padronizar a concentração dos óleos em 3,2 mg.mL<sup>-1</sup>, tendo em vista que a concentração inicial observada na literatura para testes de susceptibilidade utilizando extratos vegetais fica em torno de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>.

Sendo assim, em uma balança analítica de alta precisão e dentro de microtubos de 1,5 mL, pesou-se uma massa equivalente a 3,2 mg de cada uma das amostras de óleos essenciais. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados ao microtubo 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 900µL e meio RPMI 1640, resuspendendo a solução após a adição dos reagentes e homogeneizando manualmente os eppendorfs.

### 1.2.2.3 Microdiluição em placa

Este bioensaio consiste em uma diluição seriada das substâncias testes e foi realizado em microplacas de 96 poços estéreis e com o auxílio de micropipeta multicanal para adição dos reagentes. As concentrações da diluição seriada empregadas no ensaio com as amostras de óleos essenciais foram as seguintes: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1.2).

Primeiramente, adicionou-se 100 µL do meio de cultivo RPMI 1640 em todos os 12 poços. Depois, foram dispensados 100 µL do fármaco-padrão fluconazol (concentração inicial: 256 µg.mL<sup>-1</sup>) nos poços das colunas 1 e fileiras A e B. A coluna 1 continha a maior concentração do fármaco (64 µg.mL<sup>-1</sup>) e a coluna 10, a menor concentração (0,125 µg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, realizou-se o mesmo procedimento com as amostras testes, as quais foram colocadas na coluna 1 e fileiras de C a H. Então, realizou-se a diluição seriada das amostras que iniciava na coluna 1 e terminava na coluna 10, desprezando-se o volume restante.

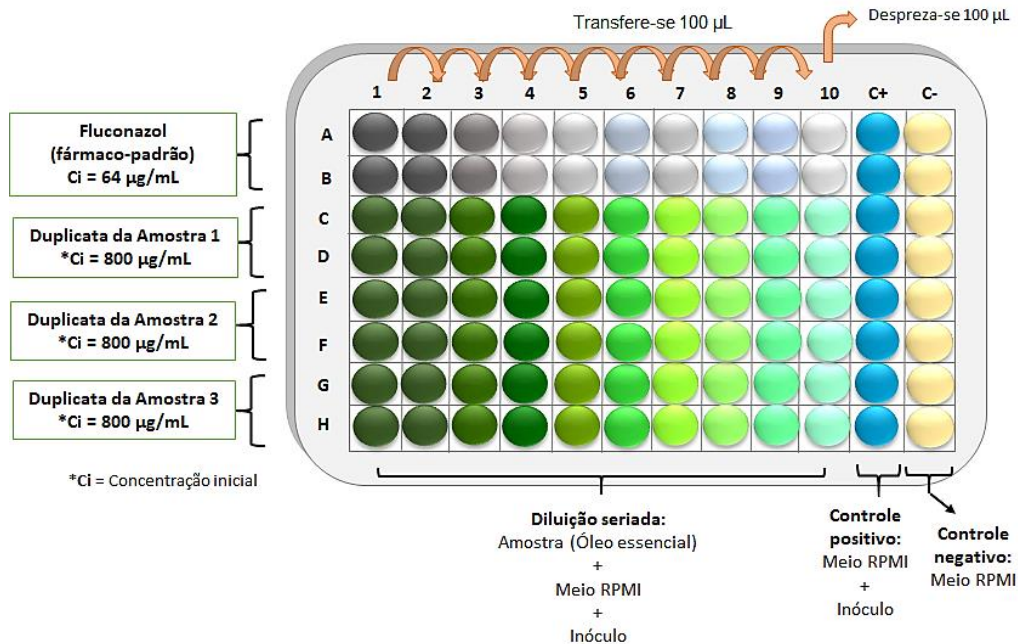
Logo após estas etapas, depositou-se 100 µL da suspensão do inóculo em todos os poços das colunas 1 a 10, fazendo com que a concentração do inóculo fosse diluída no poço, passando

de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os poços da coluna 11 representam o controle positivo de crescimento dos microrganismos no teste, por isto, receberam apenas 100µL de meio estéril e 100µL do inóculo. Já a coluna 12 da placa de microdiluição representa o controle negativo do teste, ou seja, contém apenas o meio de cultivo, sem a amostra teste e sem o inóculo.

Por fim, as placas de microdiluição foram mantidas em estufa a 35°C por 24 horas (*C.albicans*) e 96h (*T.rubrum*). Em seguida, o crescimento celular e a atividade inibitória do fármaco de referência e dos óleos essenciais testados foram observados, analisando-se os resultados visualmente. A Figura 1.12 ilustra o procedimento descrito acima

**Tabela 1.2.** Demonstração da diluição seriada das amostras por cada poço da microplaca.

CIMs das amostras em cada poço da Microplaca										
Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625



**Figura 1.12.** Exemplo de procedimento de microdiluição em caldo para verificação de ação inibitória das amostras de óleos essenciais sobre as cepas fúngicas. **Fonte:** A autora.

#### 1.2.2.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Realizou-se a leitura dos resultados através da determinação da CIM de cada placa visualmente, comparando a quantidade de crescimento dos poços que continham o fármaco-padrão e os óleos essenciais com a quantidade de crescimento para cada fungo nos poços de controle positivo.

O parâmetro avaliativo consistiu em utilizar como “ponto de corte” o poço contendo a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento dos fungos testados, ou seja, os poços que se apresentaram opticamente claros e sem nenhum crescimento. A leitura para *C.albicans* foi realizada após 24 horas de incubação das placas, enquanto que o *T.rubrum* foi lido num período de 96h de incubação, conforme preconizado pela CLSI.

#### **1.2.2.5 Seleção dos óleos com maior potencial antifúngico**

Os óleos que apresentaram maior potencial de inibição fúngica, ou seja, que obtiverem CIM com 90% de atividade inibitória contra ambas as cepas de *C.albicans* e *T.rubrum*, foram selecionados para as próximas etapas relacionadas ao preparo das microemulsões e descritas no Capítulo 2.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de microdiluição em caldo realizado no presente estudo com os óleos essenciais de *A. canelilla*, *A. parviflora*, *A. rosaeodora*, *O. cymbarum*, *M. officinalis*, *C. citratus*, *P. nigrum* e *C. camphora* contra as cepas de *C. albicans* e *T. rubrum* estão demonstrados na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais analisados contra cepas de *C. albicans* e *T. rubrum*.

Óleo essencial (espécie)	<i>T. rubrum</i> (ATCC) CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<i>C. albicans</i> (ATCC) CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>A. canelilla</i>	800	800
<i>A. parviflora</i>	>800	>800
<i>A. rosaeodora</i>	800	>800
<i>O. cymbarum</i>	800	>800
<i>M. officinalis</i>	400	400
<i>C. citratus</i>	400	800
<i>P. nigrum</i>	>800	>800
<i>C. camphora</i>	>800	400
Fluconazol	3,125	12,5

Analisando a tabela acima, é possível observar que, dentre os oito óleos essenciais avaliados, aqueles que demonstraram maior atividade antifúngica, ou seja, que tiveram menor CIM frente ao dermatófito *T. rubrum* foram os óleos de *M. officinalis* e *C. citratus*, os quais apresentaram o mesmo valor de CIM correspondente a  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O autor Mimica-Dukic e seus colaboradores (2004) testaram a atividade antifúngica do óleo essencial da *M. officinalis* contra cepas de *T. rubrum* pela técnica de microdiluição e obtiveram CIM correspondente a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estes valores corroboram com o resultado do presente estudo, onde o óleo também foi bastante ativo contra tal fungo, porém com maior valor de CIM. O estudo de Wannissorn, Jarikasem e Soontorntanasart (1996) analisou a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra *T. rubrum* através do método de difusão em ágar e obtiveram CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que também demonstrou a boa atividade inibitória do óleo contra o fungo. O citral é uma mistura de dois isômeros geométricos, neral (cis-isômero) e geranial (trans-isômero) (KIKONYOGO *et al.*, 1999), que consistem no componente majoritário dos óleos de *M.*

*officinalis* e *C. citratus*. Miron e colaboradores (2014) utilizaram o método de microdiluição em caldo com faixa de concentração de 0,25 a 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para avaliar a atividade contra *T. rubrum* e *C. albicans* das substâncias isoladas do óleo essencial de *C. citratus* (citral, neral e geranial). As CIMs de 4, 32, e 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram obtidas para *T. rubrum*, respectivamente, enquanto a *C. albicans* foi sensível apenas frente ao citral (CIM de 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). O estudo revelou também que o citral foi o monoterpene com maior atividade antifúngica contra leveduras, mas também que o citral e seus isômeros foram muito mais eficazes contra *T. rubrum*, demonstrando que os monoterpenos são mais ativos contra dermatófitos do que contra as leveduras. Com base nisso, é possível atribuir a expressiva atividade antifúngica de ambos os óleos essenciais ao citral, que se revela muito efetivo em razão da combinação de isômeros que o forma. Kurita e seus colaboradores (1981) sugerem que a atividade antifúngica do citral deve-se à sua capacidade de formar um complexo de transferência de carga com o triptofano das células fúngicas, o que ocasiona a morte dos fungos e, de acordo com Harris (2002), o citral parece atuar principalmente na membrana celular fúngica, afetando sua estrutura, bloqueando sua síntese e causando a morte celular, enquanto inibe a germinação, proliferação e respiração celular dos esporos.

Os óleos essenciais das espécies *A. canelilla*, *A. rosaedora* e *O. cymbarum* demonstraram atividade moderada contra a cepa de *T. rubrum*, pois suas CIMs tiveram o mesmo valor de 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que foi igual à concentração máxima testada no presente trabalho. Devido à escassez de pesquisas relacionadas às atividades antifúngicas dos óleos supracitados contra a cepa de *T. rubrum*, não foram relatados dados comparativos para tais espécies.

Já para as espécies *A. parviflora*, *P. nigrum* e *C. camphora*, não foi possível determinar as CIMs, pois não apresentaram atividade desde a 1ª diluição testada (CIM > 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos das folhas de espécies do gênero *Cinnamomum* (*C. pubescens*, *C. impressicostatum*, *C. rhyncophyllum*, *C. cordatum*, *C. zeylanicum*, *C. microphyllum*, *C. mollissimum* e *C. scortechini*) foram testadas por Jantan e colaboradores (2008) contra seis espécies de dermatófitos, dentre as quais o *T. rubrum*, pelo método de microdiluição em caldo com algumas modificações. Todos os óleos se mostraram fortemente ativos, com CIMs variando de valores menores que 0,04 a 0,31  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A atividade antifúngica de 13 compostos padrão também foram testadas pelos pesquisadores, que verificaram que as amostras foram eficazes contra os fungos testados, exibindo valores de CIM menores que 1,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O linalol e a cânfora, componentes majoritários da *C. camphora*,

também foram testados e mostraram-se muito ativos contra o fungo, com as respectivas CIMs de 0,16 e 0,31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estes resultados evidenciam que o gênero *Cinnamomum* possui atividade muito promissora contra *T. rubrum* por conta da ação inibitória de seus componentes majoritários contra a cepa. Em contrapartida, o óleo essencial da espécie *C. camphora* não demonstrou atividade contra tal patógeno no presente estudo e, um fator que pode estar relacionado a isso é a variação de teor de metabólitos secundários nas plantas, frente às diferenças climáticas, de plantio, colheita e método de extração.

No caso da *C. albicans*, as espécies mais ativas no presente trabalho foram a *C. camphora* e a *M. officinalis*, que apresentaram CIM de 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em 2008, o óleo essencial das folhas de *C. camphora* foi testado contra cepa de *C. albicans* pelo método de macrodiluição em caldo por Dutta e colaboradores (2007), que observaram CIM de 3180  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , tendo o presente estudo demonstrado que a atividade do óleo essencial da *C. camphora* foi eficaz em uma concentração bem menor. Jantan e colaboradores (2008) também avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos das folhas de espécies do gênero *Cinnamomum* (*C. pubescens*, *C. impressicostatum*, *C. rhyncophyllum*, *C. cordatum*, *C. zeylanicum*, *C. microphyllum*, *C. mollissimum* e *C. scortechini*) contra cinco leveduras, dentre estas a *C. albicans*, pelo método de método de microdiluição em caldo. Em relação à atividade contra *C. albicans*, os óleos essenciais de *C. cordatum* e *C. zeylanicum* foram os mais ativos, ambos com CIMs de 0,63  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que os outros apresentaram atividades moderadas ou fracas. Por outro lado, a atividade antifúngica de 13 compostos padrão testadas pelos pesquisadores demonstraram que as amostras foram eficazes contra os fungos testados, com CIMs menores que 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O linalol e a cânfora, principais componentes da *C. camphora*, mostraram CIMs de 0,63 e 3,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , indicando que o linalol é o componente mais ativo contra *C. albicans*. Assim, possivelmente esses dois compostos trabalham de modo sinérgico, conduzindo ao aumento do efeito antifúngico contra a levedura.

Mimica-Dukic e colaboradores (2004) também testaram a atividade antifúngica do óleo essencial da *M. officinalis* contra cepas de *C. albicans* pela técnica de microdiluição e também encontraram uma CIM significativa desse óleo, correspondente a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A atividade antifúngica do óleo essencial *M. officinalis* também foi estudada por Donaldson e seus colaboradores (2005) contra *C. albicans* utilizando o método por diluição em tubo, que avaliou uma faixa de diluição entre 10 $\mu\text{L}$  a 0,3 $\mu\text{L}$ . Eles determinaram uma CIM de 1,25% para *M. officinalis*. A literatura demonstra que o citral possui diversas atividades comprovadas, como já mencionado anteriormente, dentre as quais está a ação fungicida (SOUSA *et al*, 2016).

Apesar do óleo de *C. citratus* ter sido tão ativo quanto o óleo de *M. officinalis* contra a cepa de *T. rubrum*, este último óleo essencial apresentou maior atividade inibitória frente à *C. albicans*. Embora a quantidade de citral seja maior no óleo de *C. citratus*, como já foi mencionado anteriormente (65-80%) (LEAL *et al.*, 2003), a atividade da *M. officinalis* pode estar atrelada não somente ao citral (10-30%), mas também ao citronelal (2-40%), outro composto majoritário de quantidade bem pronunciada no óleo dessa planta (KREIS; MOSANDL, 1994), ou até mesmo isso pode estar relacionado a características específicas da levedura estudada.

Os óleos essenciais das espécies de *C. citatus* e *A. canelilla* tiveram atividade moderada contra a cepa de *C. albicans*, com CIMs de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que corresponde à concentração máxima testada no presente trabalho. A literatura demonstra que um estudo realizado pelos pesquisadores Ahmad e Viljoen (2015) investigou a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra *C. albicans*, utilizando o método de microdiluição em caldo, e obtiveram uma CIM de 63  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo que a maior concentração analisada foi de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No ano seguinte, Akinkunmi e colaboradores (2016) também fizeram o teste de atividade antifúngica pelo mesmo método e contra o mesmo fungo, mas com uma faixa de concentração de 10,0 a 0,3125% (v/v); eles ainda avaliaram o efeito que o tempo de armazenamento (armazenagem a 4 °C em frasco âmbar) causava no óleo essencial de *C. citratus* nos estados (a) fresco, (b) após 2 anos e (c) após 9 anos, encontrando CIMs de, respectivamente, 0,625%, menor que 0,3125% e menor que 0,3125%, constatando que este óleo essencial fica mais ativo com o passar do tempo. O óleo essencial de *C. citratus* tem, de fato, uma boa atividade contra *C. albicans*. Tyagi e Malik (2010) testaram os óleos essenciais de *Mentha piperita* (menta), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *C. citratus* contra cepa de *C. albicans* numa faixa de concentração de 18000 a 144  $\text{mg.L}^{-1}$  pelo método de microdiluição em caldo. Dentre os três, o óleo de *C. citratus* foi o que apresentou maior atividade antifúngica (CIM de 228  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguido pela *M. piperita* (CIM de 1125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *E. globulus* (CIM de 2250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Vale ressaltar que, no presente trabalho, a menor atividade antifúngica do óleo de *C. citratus* frente a *C. albicans* foi de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultado este que conflita com os dados da literatura, que demonstram CIMs bem mais baixas deste óleo em relação à sua ação inibitória frente à *C. albicans*.

Um estudo de Oger e colaboradores (1994) demonstrou a composição química e atividade fungistática do 1-nitro-2-feniletano (89,80%), componente majoritário da *A. canelilla*, contra cepa clínica (isolada de paciente) de *C. albicans* através do método de microdiluição. O valor de CIM obtido no estudo foi de 170  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , constatando uma boa atividade do composto contra a cepa. Nogueira e colaboradores (2011), por sua vez, também testaram a atividade do



óleo essencial de *A. canelilla* frente ao mesmo agente etiológico (cepa padrão) e pelo mesmo método, e obtiveram valor de CIM maior que  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foi considerado pelos autores inativo para o teste. Em contrapartida, no presente trabalho, o seu óleo essencial apresentou CIM a  $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , tanto frente à cepa de *C. albicans* quanto à do *T. rubrum*. Comparando esses dados da literatura, que divergem entre si, com a atividade moderada do óleo essencial de *A. canelilla* verificada no presente estudo, é possível também atribuir essa incongruência de dados ao fornecedor, já que a etapa de extração dos óleos essenciais não foi realizada no presente projeto, assim como não foi realizada a caracterização da composição química do óleo essencial da *A. canelilla*. Como evidenciado pelo estudo de Oger e colaboradores (1994), a atividade desta espécie deve-se ao teor de 1-nitro-2-feniletano presente no óleo.

Os óleos essenciais de *A. parviflora*, *A. rosaeodora*, *O. cymbarum* e *P. nigrum* não tiveram suas CIMs determinadas, uma vez que nenhum deles foi ativo nas faixas de concentrações testadas no ensaio de microdiluição deste projeto ( $\text{CIM} > 800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Não foram encontrados dados na literatura que demonstrassem a atividade de *A. parviflora* contra *C. albicans*. D'auria e colaboradores (2005) avaliaram a composição química e atividade antifúngica contra cepa de *C. albicans*, do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e de um de seus compostos majoritários isolado, o linalol. Eles verificaram que o teor de linalol presente no óleo essencial de *L. angustifolia* foi de 32,75% e a CIM do óleo foi de 0,50% (v/v), enquanto a CIM do composto isolado foi de 0,06 % (v/v). Este estudo demonstrou que o linalol, de fato, é muito ativo contra *C. albicans* mesmo em baixas concentrações. Apesar de não ter sido encontrado dado na literatura que demonstrasse a atividade de *A. parviflora* contra *C. albicans*, pode-se considerar a atividade da *A. rosaeodora*, levando em conta que ambas são plantas do mesmo gênero e que possuem como composto majoritário o linalol, mas o mesmo está presente em menor teor nesta espécie, variando de 32 a 40% (MAIA *et al.*, 2007), do que na *A. rosaeodora*, cuja quantidade varia entre 38,48% a 71,05% (ZOGHBI *et al.*, 2015).

*A. rosaeodora* teve a atividade antifúngica de seu óleo essencial estudada por Donaldson e seus colaboradores (2005) contra *C. albicans* através do método por diluição em tubo, que avaliou uma faixa de diluição entre  $10 \mu\text{L}$  a  $0,3 \mu\text{L}$ . Eles observaram uma CIM de 4,17% para o óleo *A. rosaeodora*, demonstrando uma atividade inibitória fraca, assim como a obtida no presente estudo. Em uma pesquisa que envolveu 52 óleos essenciais das mais variadas espécies de plantas, dentre as quais *A. rosaeodora*, *C. citratus* e *P. nigrum*, Hammer, Carson e Riley (1999) testaram a atividade antimicrobiana desses óleos pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo contra 10 microrganismos diferentes, dentre eles a *C. albicans*. No teste

de difusão em ágar, a maior concentração de inibição foi de 2%. O óleo essencial de *C. citratus* inibiu a *C. albicans* numa concentração de 0,06%, enquanto que *A. rosaeodora* e *P. nigrum* apresentaram CIMs de 0,25% e maior que 2,0%, respectivamente. Já no ensaio de microdiluição em caldo para *C. albicans*, a faixa utilizada de concentração foi de 8,0 a 0,008% (v/v). O óleo de *A. rosaeodora* apresentou CIM de 0,12%, já a do *C. citratus* foi de 0,06%. Em contrapartida, o óleo de *P. nigrum* não foi testado por esse método, tendo em vista que não apresentou atividade antifúngica no teste anterior de triagem dos óleos (CIM > 2,0%). Neste estudo, o óleo de *A. rosaeodora* se mostrou relativamente ativo frente à levedura, contudo, pode ser observado que o *C. citratus* foi o óleo que teve maior atividade dentre os três em ambos os ensaios e que o óleo de *P. nigrum* não apresentou qualquer ação antifúngica. Esses resultados corroboram com os demonstrados na Tabela 1.3, com exceção da *A. rosaeodora*, que foi mais ativo nos experimentos relatados anteriormente do que no presente estudo, onde não demonstrou atividade (CIM > 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Em 2013, de Rapper e seus colaboradores realizaram o teste de microdiluição em caldo frente à cepa de *C. albicans* com o óleo essencial de *P. nigrum* em concentrações de diluição seriada de 8000 a 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A CIM obtida foi de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que corrobora com o resultado encontrado do presente estudo (CIM > 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esses autores partiram de uma concentração inicial dez vezes maior (8000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em seu ensaio do que a realizada no presente trabalho (800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e isso os possibilitou determinar o valor acima de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do óleo *P. nigrum* capaz de inibir a *C. albicans*.

O óleo essencial de *O. cymbarum* não demonstrou atividade contra *C. albicans* no presente estudo (CIM > 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Não foram encontrados estudos sobre o óleo na literatura para comparação com o presente resultado. Contudo, um outro óleo do mesmo gênero *Ocotea*, o óleo essencial de *Ocotea odorifera* Vell., foi testado por Castro e Lima (2011) através da técnica de microdiluição em caldo com adaptações, contra cepas padrão de *C. albicans*, em uma faixa de concentração que foi de 5.000 a 39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As CIMs corresponderam a valores que variaram entre 2.500 e 5.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , demonstrando que o óleo teve pouca atividade contra a levedura. Tendo em vista que, se o componente majoritário é o safrol (BARREIRO; FRAGA, 1999), assim como na *O. cymbarum*, pode-se inferir que o resultado da *O. odorifera* corrobora com o encontrado no presente estudo, pois a atividade em ambos os óleos só foi possível de ser determinada em concentrações acima de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Contudo, outro estudo, de Kubo, Muroi e Himejima (1993), também utilizaram o mesmo método, com concentração máxima de 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e obtiveram CIM do safrol contra *C. albicans* de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Isso só reforça a

ideia de que o safrol como substância isolada é bem efetivo contra a levedura, e que os resultados encontrados no óleo de *O. cymbarum* e *O. odorifera* possivelmente estão relacionados ao baixo teor de safrol em ambas as espécies, ou à sua interação com outros compostos presentes nos óleos que podem comprometer sua ação fungicida.

Após o exposto, observou-se que alguns dos óleos avaliados neste estudo tiveram valores de atividade antifúngica contra *C. albicans* e *T. rubrum* similares aos reportados na literatura. Foi possível, inclusive, perceber a necessidade de novos estudos relacionados à susceptibilidade antifúngica contra tais cepas pelos óleos essenciais das plantas investigadas, principalmente aqueles extraídos de espécies nativas da Amazônia, pois as raras pesquisas disponíveis focam na elucidação da composição ou na avaliação da atividade antifúngica dos compostos majoritários isolados, e o óleo bruto acaba sendo pouco pesquisado.

Diante disto, e considerando que os dados epidemiológicos apontam para *T. rubrum* e *C. albicans* como os agentes etiológicos mais prevalentes nas onicomicoses, selecionou-se os óleos essenciais de *C. citratus* (capim-limão) e *M. officinalis* (erva-cidreira) para o desenvolvimento das formulações microemulsionadas (que serão discutidas a seguir, no Capítulo 2), visto que foram os óleos que apresentaram melhor atividade para ambas as espécies fúngicas (Tabela 1.3).

## 1.4 REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, F.; BOUDJELLA, H.; ZITOUNI, A.; HASSANI, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of algerian *Melissa officinalis* L. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 13, p. 772–781, 2014.
- AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, n. 6, p. 657-665, 2015.
- AKINKUNMI, E. O.; OLADELE, A.; ESHO, O.; ODUSEGUN, I. Effects of storage time on the antimicrobial activities and composition of lemon grass oil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.3, p. 105-111, 2016.
- ALIJANIHA, F.; NASERI, M.; AFSHARYPUOR, S.; FALLAHI, F.; NOORBALA, A.; MOSADDEGHF, M.; FAGHIHZADEH, S.; SADRAI, S. Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, n. 22, p. 378-384, 2015.
- ALVES, F. M.; DOMINGOS, D. Q.; VAZ, P. P.; ARRUDA, R. C. O.; SOUZA, V. C. Checklist de Lauraceae Juss. para Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, p. 231-238, 2018.
- AMEEN, M. M. D. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 197-201, 2010.
- AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.
- ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 445-455, 2003.
- ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES, K. M. S.; SOUZA-NETO, F. C. V.; DUARTE, G. P.; BORGES, R. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 55-62, 2014.
- AZAMBUJA, C. V. A.; PIMMEL, L. A.; KLAFKE, G. B.; XAVIER, M. O. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 581-586, 2014.
- BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220-228, 2014.
- BALLESTÉ, D. R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomicosis. Revisión del tema. **Revista Médica del Uruguay**, v. 19, n. 2, p. 93-106, 2003.
- BANDONI, A. L. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v.22, n.5, 744-759, p. 1999.

BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN, MEDAB, A.; BAYALAA, B.; OBAMEA, L. C.; ILBOUDO, A. J.; FRANZB, C.; NOVAKB, J.; NEBIÉC, R. C.; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1070-1074, 2011.

BATISTA, Luana Travassos. Atividade biológica e obtenção de um fitocosmético do óleo essencial e de extratos de *Aniba parviflora* (Meisn) Mez. (Lauraceae). 2014. 120f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Escola Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

BERG, M. E. V. D. **Plantas Medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: CNPq/PTU, 1982. 55-56p.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1 ed. Curitiba: Layer Graf, 2009. 21-55p.

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

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Série: Em busca da identidade regional. Manaus: Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BRASIL. IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Portaria n. 006/92-N. Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, 1992.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; CAVALCANTE, C. S. P.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J. J. C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 131-135, 2005.

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

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J. M. **Plantas que ajudam o homem: guia prático para a época atual**. 5 ed. São Paulo: Pensamento, 1991. 143p.

CARRERO, G. C.; PEREIRA, R. S.; JACAÚNA, M. A.; LIMA JUNIOR, M. J. V. **Árvores do Sul do Amazonas. Guia de espécies de interesse econômico e ecológico**. Manaus: IDESAM, 2014. 82p.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; TUR-TUR, C.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

CASTILLO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25-35, 2017.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, codimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 108-109p.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/pimentadoreino.htm>> Acesso: 6 jul. 2018.

CHELLIAH, D. A. Biological activity prediction of an ethno medicinal plant *Cinnamomum camphora* through bio-informatics. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, n. 2, p. 181-190, 2008.

CHEN, H. P.; YANG, K.; YOU, C. X.; LEI, N.; SUN, R. Q.; GENG, Z. F.; MA, P.; CAI, Q.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Chemical constituents and insecticidal activities of the essential oil of *Cinnamomum camphora* leaves against *Lasioderma serricorne*. **Journal of Chemistry**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

CHEN, Y.; DAI, G. Acaricidal activity of compounds from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl against the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. **Pest Management Science**, v.71, n.11, p. 1561-1571, 2015.

CHIACCHIO, N.; SUAREZ, M. V.; MADEIRA, C. L.; LOUREIRO, W. R. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, Supl. 1, p. 1-12, 2013.

CHINELLI, P. A. V.; SOFIATTI, A. A.; NUNES, R. S.; MARTINS, J. E. C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 259-263, 2003.

CHRISTENSON, J. K.; PETERSON, G. M.; NAUNTON, M.; BUSHELL, M.; KOSARI, S.; BABY, K. E.; THOMAS, J. Challenges and opportunities in the management of onychomycosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 87, p. 1-10, 2018.

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

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

CNCFLORA. *Ocotea cymbarum* in Lista Vermelha da flora brasileira. Centro Nacional de Conservação da Flora. 2012. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea cymbarum](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea_cymbarum)>. Acesso em 3 jan. 2017.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v 4. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 706p.a

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v 5. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 414-477p.b

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v 2. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 113-114p.c

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis: Vozes, 1998. 98-123p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v. 1. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. 360-703p.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

COSTA, P. R. C. **Plantas medicinais nativas e aclimatadas da região Amazonica**. v 1. 1 ed. Manaus: Imprensa Oficial, 1990. 53-65p.

D'AURIA, F. D.; TECCA, M.; STRIPPOLI, V.; SALVATORE, G.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, v. 43, p. 391-396, 2005.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN, J.S., ANAISSIE, E. J. Chapter 8: *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M.; PFALLER, M. **Clinical Mycology**. 2 ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. 197p.

DRAKENSJÖ, I. T.; CHRYSANTHOU, E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 484-488, 2011.

DA SILVA, J. K.; SOUSA, P. J.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.23, p. 9422-9426, 2007.

DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S; DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic properties of *Aniba parviflora* essential oils from the Amazon. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 7, p. 1025-1028, 2016.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H. J. D.; OINONEN, P. P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 391-400, 2008.

Useful Tropical Plants Database. *Aniba canelilla* Images. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Aniba+canelilla>> acesso: 6 de julho de 2018.

DE LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6-7, p. 555–559, 2009.

DE MOURA, V. M.; DA COSTA GUIMARÃES, N.; BATISTA, L. T.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; DE SOUSA MARTINS, J.; DE SOUZA, M. C. S.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P. D.; MONTEIRO, W. M.; DE OLIVEIRA, R. B.; DOS-SANTOS, M. C.; MOURÃO, R. H. V. Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of *Aniba fragrans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 350-358, 2018.

DE RAPPER, S.; KAMATOU, G.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aromatherapeutic oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

DE SOUSA, A. C.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; GATTASS, C. R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 677-681, 2004.

DHIFI, W, BELLILI, S, JAZI, S, BAHLOUL, N, MNIF, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 1-16, 2016.

DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; DOS SANTOS, C. M.; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 1989. 50p.

DONALDSON, J. R.; WARNER, S. L.; CATES, R. G.; YOUNG, D. G. Assessment of antimicrobial activity of fourteen essential oils when using dilution and diffusion methods. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 8, p. 687-695, 2005.

DOS SANTOS, J. M. C. G.; DE MENEZES, C. P.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis* on *Cladosporium sphaerospermum* isolates. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 51, n. 2, 2018. Disponível em: <<http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/224/129>> Acesso: 31 jul. 2018.

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; BENCHIMOL, R. L.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; SOUZA, G. F. **Coleção Plantar. Pimenta-do-reino**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

DUTTA, B. K.; KARMAKAR, S.; NAGLOT, A.; AICH, J. C.; BEGAM, M. **Mycosis**, v. 50, n. 2, p. 121-124, 2007.

EMBRAPA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 16-17p.



ELHASSAN, I. A.; ELTAYEB, I. M.; KHALAFALLA, E. B. Physicochemical investigation of essential oils from three *Cymbopogon* species cultivated in Sudan. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 24-29, 2016.

EL OUADI, Y.; MANSSOURI, M.; BOUYANZER, A.; MAJIDI, L.; BENDAIF, H.; ELMSELLEM, H.; SHARIATI, M.A.; MELHAOUI, A.; HAMMOUTI, B. Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 321-326, 2017.

FARHANG, V.; AMINI, J.; JADAVI, T.; NAZEMI, J.; EBADOLLAHI, A. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. against three *Phytophthora* species. **Greener Journal of Biological Science**, v. 3, n. 8, p. 292-298, 2013.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FELSEMBURGH, C. A.; PELEJA, V. L.; CARMO, J. B. Fenologia de *Aniba parviflora* (Meins.) Mez. em uma região do estado do Pará, Brasil. **Biota Amazonia**, v. 6, n. 3, p. 31-39, 2016.

FINTELMANN, V.; WEISS, R. F. **Manual de fitoterapia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 195p.

FRANCISCO, C. H.; MIRANDA, I. S. Distribution and conservation of *Aniba* Aubl. (Lauraceae Jussieu) species in Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3, p. 1-16, 2018.

FRLHT. Foundation for Revitalisation of Local Health Traditions. Plant specie - *Piper nigrum* L. Disponível em: < <https://is.gd/MZO25b> > Acesso: 6 dez. 2016.

GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; DE MATTOS, C. B.; BALDISSERA, M. D.; SAGRILLO, M. R.; MONTEIRO, S. G.; CUSTÓDIO, D. L.; SOUZA DE MATOS, M.; SAMPAIO, P. T.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S.; DA VEIGA JUNIOR, V. F. Trypanocidal activity of the compounds present in *Aniba canelilla* oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 13-18, 2017.

GBENOU, J. D.; AHOUNOU, J. F.; AKAKPO, H. B.; LALEYE, A.; YAYI, E.; GBAGUIDI, F.; BABA-MOUSSA, L.; DARBOUX, R.; DANSOU, P.; MOUDACHIROU, M.; KOTCHONI, S. O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1127-1134, 2013.

GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F. G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; URRUTIA, M.; ZAROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, n. 3, p. 111-116, 2009.

GOMES, E. C. Capim-limão - *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Subsídios para melhoria de qualidade do cultivo, industrialização e comercialização no estado do PARANÁ. 2003. 184f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. **Perfumery and Essential Oil Record**, v. 51, p. 18-21, 1960.

GHANNOUM, M. A.; ISHAM, N. C. Chapter 16: Dermatophytes and dermatophytoses. In: **Clinical Mycology**. 2 ed. Churchill Livingstone, 2009. 375p.

GUO, S.; GENG, Z.; ZHANG, W.; LIANG, J.; WANG, C.; DENG, Z.; DU, S. The chemical composition of essential oils from *Cinnamomum camphora* and their insecticidal activity against the stored product pests. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1-9, 2016.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st Century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. **Plantas medicinais: do curso de plantas medicinais**. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem, 2010. 192-203p.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **Internacional Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 2, p. 83-91, 2002.

HART, M.; FEHRENBACHER, L. Onychomycosis: clinical considerations and recommendations. **U.S. Pharmacist**, v. 39, n. 6, p. 34-38, 2014.

HAY, R. Therapy of Skin, Hair and Nail Fungal Infections. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 1-13, 2018.

HEIDRICH, M. R. G.; STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; DABOIT, T. C.; VETORATTO, G.; SCHWARTZ, J.; AMARO, T. G.; SCROFERNEKER, M. L. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v. 9, n. 8, p. 865-871, 2015.

IRKIN, H.; KORUKLUOGLU, M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 1, p. 193-197, 2009.

JANTAN, I. B.; MOHARAM, B. A. K.; SANTHANAM, J.; JAMAL, J. A. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 6, p. 406-412, 2008.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 168, n. 4, p. 165-173, 2009.

JEENA, K.; LIJU, V. B.; UMADEVI, N. P.; KUTTAN, R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* Linn). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2014.

JEELLINEK, N. J.; RICH, P.; PARISER, D. M. Understanding onychomycosis treatment: mechanisms of action and formulation. In: ARDNT, K. A.; LEBOIT, P. E.; WINTROUB, B. U. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 34, n. 3S, p. 51-55, 2015.

KIKONYOGO, A.; ABRIOLA, D. P.; DRYJANSKI, M.; PIETRUSZKO, R. Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. **European Journal of Biochemistry**, v. 262, p. 704-712, 1999.

KIM, E. H.; KIM, H. K.; AHN, Y. J. Acaricidal activity of plant essential oils against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 6, n. 1, p. 77-82, 2003.

KIM, S. I.; YI, J. H.; TAK, J. H.; AHN, Y. J. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 4, p. 297-304, 2004.

KREIS, P.; MOSANDL, A. Chiral compounds of essential oils. Part XVI. enantioselective multidimensional gas chromatography in authenticity control of balm oil (*Melissa officinalis* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, p. 249-256, 1994.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 2, p. 220-226, 1993.

KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal Activity of Components of Essential Oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 945-952, 1981.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS, S. P.; SILVA, J. F.; CARVALHO, A. J. C. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 5, p. 61-64, 2003.

LECHA, M.; EFFENDY, I.; CHAUVIN, M. F.; CHIACCHIO, N. D.; BARAN, R. Treatment options - development of consensus guidelines. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, Supl. 1, p. 23-33, 2005.

LEE, H. J.; HYUN, E. A.; YOON, W. J.; KIM, B. H.; RHEE, M. H.; KANG, H. K.; CHO, J. Y.; YOO, E. S. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 208-216, 2006.

LEITE JR, D. P.; AMADIO, J. V. R. S.; SIMÕES, S. A. A.; ARAÚJO, S. M.; DA SILVA, N. M. R.; ANZAI, M. C.; HAHN, R. C. Dermatophytosis in military in the central-west region of Brazil: literature review. **Mycopathologia**, v. 177, p. 65-74, 2014.

- LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 344p.
- LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; DE SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LIMA, K. M.; RÊGO, R. S. M.; MONTENEGRO, F. Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. **NewsLab**, 83 ed., p. 184-196, 2007.
- LIMA, M. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 329-330, 2004.
- LINGARAJU, D. P.; SUDARSHANA, M. S.; RAJASHEKAR, N. Ethnopharmacological survey of traditional medicinal plants in tribal areas of Kodagu district, Karnataka, India. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 2, p. 284-297, 2013.
- LI, Q.; WANG, X. X.; LIN, J. G.; LIU, J.; JIANG, M. S.; CHU, L. X. Chemical composition and antifungal activity of extracts from the xylem of *Cinnamomum camphora*. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2560-2571, 2014.
- LIU, C. H.; MISHRA, A. K.; TAN, R. X.; TANG, C.; YANG, H.; SHEN, Y. F. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1969-1973, 2006.
- LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; MARI, C. R. D.; OLIVEIRA, L. T. O.; BRUM, L. M.; WESTPHALEN, J. B.; FURIAN, F. W.; ALTERMANN, M. J. A Ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 3, p. 147-149, 1999.
- LORENZI, H.; DE SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 151p.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 2**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2013. 198p.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 312-433p.
- LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; HABBER, L. L.; MARQUEZ, M. O. M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.
- MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos acadêmicos (UNISUL)**, v.3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAJDALAWIEH, A. F.; CARR, I. R. *In vitro* investigation of the potential immunomodulatory and anti-cancer activities of black pepper (*Piper nigrum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 371-381, 2010.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; COUTO, H. A. R.; DA SILVA, A. C. M.; MARX, F.; HENKE, C. Plant sources of amazon rosewood oil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.

Marinho, T. A. S.; Wittman, F. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Dinâmica populacional de espécies madeireiras em florestas de várzea alta na RDS Mamirauá. Amazônia Central. Projeto INPA/Max-Planck. Disponível em: <<https://bit.ly/2Eg19yV>> acesso em: 12 ago. 2018.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 195-206, 2001.

MARTELOZO, I. C.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2005.

MARTÍNEZ-HERRERA, E. O.; ARROYO-CAMARENA, S.; TEJADA-GARCÍA, D. L.; PORRAS-LÓPEZ, C. F.; ARENAS, R. Onychomycosis due to opportunistic molds. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 334-337, 2015.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. B. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.161, p. 34-39, 2016.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2 ed. Fortaleza: EUFC, 1994. 74p.

MARTINS, J. E. C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. 2 ed. Belém: Cultural CEJUP, 1989. 36-48p.

MATOS, S.; MARIANO, A. Onychomycosis in a community of garbage collectors in northeast Brazil. **The Internet Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2009.

MATTOSO, E. Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia. 2005. 143f. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MAZZANTI, G.; BATTINELLIA, L.; POMPEOA, C.; SERRILLIB, A. M.; ROSSIC, R.; SAUZULOC, I.; MENGONIC, F.; VULLOC, V. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on *Herpes simplex* virus type 2 replication. **Natural Product Research**, v. 22, n. 16, p. 1433-1440, 2008.

MEIS, J. F.; VERWEIJ, P. E. Current management of fungal infections. **Drugs**, v. 61, Supl. 1, p. 13-25, 2001.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, 2004.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.

MISHRA, A. K.; DWIVEDI, S. K.; KISHORE, N.; DUBEY, N. K. Fungistatic properties of essential oil of *Cinnamomum camphora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 4, p. 259-262, 1991.

MISHRA, M.; PANDA, P.; TRIPATHY, S.; SENGUPTA, S.; MISHRA, K. An open randomized comparative study of oral itraconazole pulse and terbinafine pulse in the treatment of onychomycosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 71, n. 4, p. 262-266, 2005.

MOBIN, M.; WALDEREZ, M.; TAKAHASHI, J. P.; MARTINS, M.; HIPPIÓLITO, D. D. C.; PORTO, J. C. S.; TELES, J. B.; LIMA, S. G.; MELHEM, M. S. C. Antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from horticulturists with onychomycosis in Piauí, Brazil. **Iranian Journal of Public Health**, v. 47, n. 12, p. 1816-1821, 2018.

MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: GRUMEZESCU, A.; HOLBAN, A. M. **Soft Chemistry and Food Fermentation**. 1th ed Academic Press, 2017. 383p.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O. ; SOUZA, E. L. ; DINGENEN, M. A. V.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and  $\beta$ -pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 33-38, 2007.

MORSHEED, S.; HOSSAIN, M. D.; AHMAD; M.; JUNAYED, M. Physicochemical characteristics of essential oil of black pepper (*Piper nigrum*) cultivated in Chittagong, Bangladesh. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 4, n. 3, p. 66-69, 2017.

MORSY, N. F. S.; EL-SALAM, E. A. Antimicrobial and antiproliferative activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil and oleoresin. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 779-790, 2017.

MÜGGE, C.; HAUSTEIN, U. F.; NENOFF, P. [Causative agents of onychomycosis--a retrospective study]. **Journal of the Germany Society of Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 218-228, 2006.

NARCISO, J. O. A.; SOARES, R. O. A.; MALLET, J. R. S.; GUIMARÃES, A. E.; CHAVES, M. C. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MALECK, M. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 172, p. 1-10, 2014.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 493-497, 1994.

OHASHI, S.T.; ROSA, L.S. Pau-rosa – *Aniba rosaeodora* Ducke. **Informativo Técnico da Rede de Sementes**, n. 4, 2004. 1p. Versão on-line ISSN 1679-8058. Disponível em: <[https://www.inpa.gov.br/sementes/iT/4\\_pau-rosa.pdf](https://www.inpa.gov.br/sementes/iT/4_pau-rosa.pdf)> Acesso: 20 fev. 2017.

OLIVEIRA, C. W.; CALLADO, C. H.; MARQUETE, O. Anatomia do lenho de espécies do gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae). **Rodriguésia**, v. 52, n. 81, p. 125-134, 2001.

OLIVEIRA, J. A. A.; BARROS, J. A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. L. Superficial mycoses in the city of Manaus/AM between March and November/2003. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p. 238-243, 2006.

OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova**, v. 37, n.1, p. 69-73, 2014.

ORAV, A.; STULOVA, I.; KAILAS, T.; MÜÜRSEPP, M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.9, p. 2582–2586, 2004.

PAIVA, S. R.; SANTOS, M. G.; MORAES, M. G.; SANTOS, M. C. F.; PINTO, L. J. S. **Plantas medicinais: manual de identificação, propriedades e cultivo**. Rio de Janeiro: Populis, 2009. 25-26p.

PARISER, D. M.; JELLINEK, N. J.; RICH, P. Efficacy and safety of onychomycosis treatments: an evidence-based overview. In: ARDNT, K. A.; LEBOIT, P. E.; WINTROUB, B. U. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.34, n. 3S, p. 46-50, 2015.

PARTHASARATHY, V., A., SASIKUMAR, B.; NAIR, R.; KOKKAT, J, G. Black pepper: botany and horticulture. **Indian Institute of Spices Research**, v. 33, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470168011.ch3>> Acesso: 23 jan. 2017.

PASTORE JR, F.; ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; LEITE, F. H. F. **Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia**. Brasília: UnB, OIMT e FEPAD, 2005, 119-121p. Disponível em: <<https://bit.ly/2Ig20Ua>> Acesso em: 12 jan. 2017.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, n.4, p. 316-323, 2006.

PEANA, A. T.; D'ÁQUILA, P. S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M. D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721-726, 2002.

PEANA, A. T.; D'ÁQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 37-41, 2003.

PEDRAZZANI, A. S.; NETO, A. O. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, v. 45, p. n/a-n/a, 2014.

PELEGRINI, A.; TAKAHASHI, J. P.; PEREIRA, C. D. E. Q.; PESSONI, R. B.; SOUZA, M. C. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p. 118-120, 2009.

PEREIRA, A. I. S.; PEREIRA, A. G. S.; LOPES SOBRINHO, O. P.; CANTANHEDE, E. K. P.; SIQUEIRA, L. F. S. Atividade antimicrobiana no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educación Química**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013.

PINO, J. A.; AGÜERO, J.; FUENTES, V. Chemical composition of the aerial parts of *Piper Nigrum* L. from Cuba. **Journal of essential oil research**, v.15, n. 3, p. 209-210, 2003.

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

PUBCHEM. Database. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso: 21 nov. 2018.

QUELLER, J. N.; BHATIA, N. The dermatologist's approach to onychomycosis. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 2, p. 173-184, 2015.

QUINET, A. Uma nova espécie de *Ocotea* (Lauraceae) para o estado do Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 2, p. 339-342, 2008.

RAGGI, L. Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, C. S. C.; ZAITZ, C.; FRAMIL, V. M. S.; OTTOBONI, T. S. C.; TONOLI, M. S. C.; RIBEIRO, R. P. Descriptive study of onychomycosis in a hospital in São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 485-492, 2015.



RIBEIRO, P. G. F.; DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008. 153p.

ROBERTS, D. T.; TAYLOR, W. D.; BOYLE, J. Guidelines for treatment of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 3, p. 402-410, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1 ed. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 94-104p.

ROSEN, T.; STEIN GOLD, L. F. Antifungal drugs for onychomycosis: Efficacy, safety, and mechanisms of action. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 35, n. 3, Supl. 3, p. 51-55, 2016.

ROSZAINI, K.; NOR AZAH, M. A.; MAILINA, J.; ZAINI, S.; MOHAMMED FARIDZ, Z. Toxicity and antitermite activity of the essential oils from *Cinnamomum camphora*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca cajuputi* and *Dipterocarpus* sp. against *Coptotermes curvignathus*. **Wood Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 1273-1284, 2013.

RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. D. Manual de conduta nas onicomicoses: diagnóstico e tratamento. In: Sociedade Brasileira de Dermatologia. Manual de Conduta. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, p. 191-201, 2004.

SAMPAIO, L. F. S.; MAIA, J. G.; DE PARIJÓS, A. M.; DE SOUZA, R. Z.; BARATA, L. E. Linalool from rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) oil inhibits adenylate cyclase in the retina, contributing to understanding its biological activity. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 73-77, 2012.

SANTOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 3, p. 137-140, 1997.

SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; D' OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Antibacterial activity of the rosewood (*Aniba rosaeodora* and *A. parviflora*) linalool-rich oils from the Amazon. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 12, n. 2, p. 1-9, 2016.

SHAKERI, A.; AMIRHOSSEIN, S.; JAVADI, B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.188, p. 204-228, 2016.

SEKEROGLU, N; KAYA; D. A.; INAN, M.; KIRPIK, M. Essential oil contents and ethnopharmacological characteristics of some spices and herbal drugs traded in Turkey. **Internacional Journal of pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 256-261, 2006.

SEEBACHER, C.; BRASCH, J.; ABECK, D.; CORNELLY, O.; EFFENDY, I.; GINTER-HANSELMAYER, G.; HAAKE, N.; HAMM, G.; HIPLER, U. C.; HOF, H.; KORTING, H. C.; MAYSER, P.; RUHNKE, M.; SCHLACKE, K. H.; TIETZ, H. J. **Mycoses**, v. 50, n. 4, p. 321-327, 2007.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, p. 335-352, 2008.

SERRALVES. *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. Disponível em: <<https://bit.ly/2Itn1uL>> Acesso: 6 jul. 2018.

SHIVAKUMAR, H. N.; VAKA, S. R.; MADHAV, N. V.; CHANDRA, H.; MURTHY, S. N. Bilayered nail lacquer of terbinafine hydrochloride for treatment of onychomycosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4267-4276, 2010.

SHUKIS, A. J.; WACHS, H. Determination of safrole in the oil of *Ocotea cymbarum*. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 248-249, 1948.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 150-266p.

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population - a literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, p. 1480-1491, 2014.

SILVA, J. R. A.; CARMO, D. F. M.; REIS, E. M., MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, B. O.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA, N. N. S.; SILVA, J. R. A.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of *Aniba canelilla* essential oil. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 84, n. 2, p. 192-198, 2014.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in northeast Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2016.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. 467-472p.

SIMPANYA, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: KUSHAWA, R. K. S.; GUARRO, J. editors. *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: **Revista Iberoamericana de Micología**, 2000. 1-12p.

SINGH, R.; JAWAID, T. *Cinnamomum camphora* (Kapur): Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 4, n. 28, p. 1-5, 2012.

SINGH, S.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, G.; SCHUFF, C.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potentials of white pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil and oleoresins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India Section B - Biological Sciences, v. 83, n. 3, p. 357-366, 2013.

SOEUR, J.; MARROT, L.; PEREZ, P.; IRAQUI, I.; KIENDA, G.; DARDALHON, M.; MEUNIER, J.R.; AVERBECK, D.; HUANG, M.E. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 718, p. 24-32, 2011.

SOROCABA, Prefeitura de Observatório da Biodiversidade. Disponível em: <<https://bit.ly/2EeuZUG>> Acesso: 6 jul. 2018.

SOUSA, J.; COSTA, A.; LEITE, M.; GUERRA, F.; SILVA, V.; MENEZES, C.; PEREIRA, F.; LIMA, E. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole resistant *Candida tropicalis*. **International Journal of Tropical Disease & Health**, v. 11, n. 4, p. 1-11, 2016.

SOUZA, E. A. F.; ALMEIDA, L. M. M.; GUILHERMETTI, E.; MOTA, V. A.; ROSSI, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A.; SILVA, M. R.R. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, p. 68-71, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - Guia para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. 94p.

SURENDER, V.; RENU, S.; ASHIMA. Transungual drug delivery a pivotal remedy in onychomycosis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 370-381, 2016.

STEINER, D.; GASQUES, L.; GATTI, E. F. Micose ungueal. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, n. 12, p. 95-99, 2014.

TAHERPOU, A. A.; MAROOF, H.; RAFIE, Z.; LARIJANI, K. Chemical composition analysis of the essential oil of *Melissa officinalis* L. from Kurdistan, Iran by HS/SPME method and calculation of the biophysicochemical coefficients of the components. **Natural Product Research**, v. 26, n. 2, p. 152-160, 2012.

TELES, R. M.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SOUZA, A. G. Chemical characterization and larvicidal activity of essential oil from *Aniba duckei* Kostermans against *Aedes aegypti*. **International Journal of Life Sciences Scientific Research**, v. 3, n. 6, p. 1495-1499, 2017.

TIAGO, M. R. M.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. A. A. Pitiríase versicolor e dermatofitoses diagnosticadas entre os anos de 2006 e 2007 no laboratório de micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 45, p. 123-128, 2018.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 1-11, 2010.

TROPICOS. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/25511805>> Acesso em: 3 jan. 2017.

TROPICOS. *Melissa officinalis* L. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/17600147>> Acesso em: 12 ago. 2016.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 317-335, 1995.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SOONTORNTANASART, T. Antifungal Activity of Lemon Grass Oil and Lemon Grass Oil Cream. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 551-554, 1996.

WCMC - World Conservation Monitoring Centre. *Ocotea cymbarum*. The IUCN Red List of threatened species 1998: e.T32488A9704321. 1998. Disponível em: <<https://bit.ly/2NhXRm8>> Acesso: 20 out. 2016.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, ano XI, n. 105, p. 6 - 07, novembro/dezembro/2007.

YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012.

YANG, F.; LONG, E.; WEN, J.; CAO, L.; ZHU, C.; HU, H.; RUAN, Y.; OKANURAK, K.; HU, H.; WEI, X.; YANG, X.; WANG, C.; ZHANG, L.; WANG, X.; JI, P.; ZHENG, H.; WU, Z.; LV, Z. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 445-457, 2014.

NOGEIRA, K. L.; PINTO, A. C. S.; CARNEIRO, A. L. B.; TADEI, W. P. **Screening da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de plantas amazônicas**. XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM. Manaus, 2011. 4p. Disponível em: <<https://bit.ly/2SWe3dy>> Acesso em: 17 fev. 2018.

ZANARDI, D.; NUNES, D. H.; PACHECO, A. S.; TUBONE, M. Q.; SOUZA FILHO, J. J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 2, p. 119-124, 2008.

ZOGHBI, M. G. B.; OHASHI, S. T.; SALOMÃO, R. P.; GUILHON, G. M. S. P. Chemical variability of *Aniba rosaeodora* oils. **Global Journal of Science Frontier Research: B Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 12-22, 2015.

# **CAPÍTULO 2**

## CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melissa officinalis* L. E *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1 Microemulsões

As microemulsões (MEs) podem ser definidas como dispersões de óleo e água estabilizadas por um filme interfacial de moléculas de surfactante, tipicamente em conjunto com um coagente tensoativo, em sistemas monofásicos, transparentes, isotrópicos e termodinamicamente estáveis (FURLANETTO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). Devido às suas características peculiares, as MEs diferem das emulsões clássicas (ou macroemulsões) e nanoemulsões em alguns aspectos. O Quadro 2.1 faz um apanhado das principais características em que diferem cada um desses 3 sistemas.

**Quadro 2.1.** Principais diferenças entre sistemas macro, nano e microemulsionados.

Parâmetro	Macroemulsão	Nanoemulsão	Microemulsão
Tipo de dispersão	Grosseira	Coloidal	Coloidal
Tamanho de gotícula	> 500 nm	20-500 nm	10-100 nm
Estabilidade termodinâmica	Instável	Instável	Estável
Formação	Requer energia	Requer energia	Espontânea
Composição	Requer baixas quantidades de tensoativo	Requer baixas quantidades de tensoativo	Requer grandes quantidades de tensoativo combinado a um cotensoativo
Textura	Semissólida	Fluida	Fluida
Aparência física	Creмоса	Translúcida	Transparente
Tensão superficial	Baixa	Baixa	Muito baixa

**Fontes:** Adaptado de Gupta *et al.*, 2016; Nastiti *et al.*, 2017.

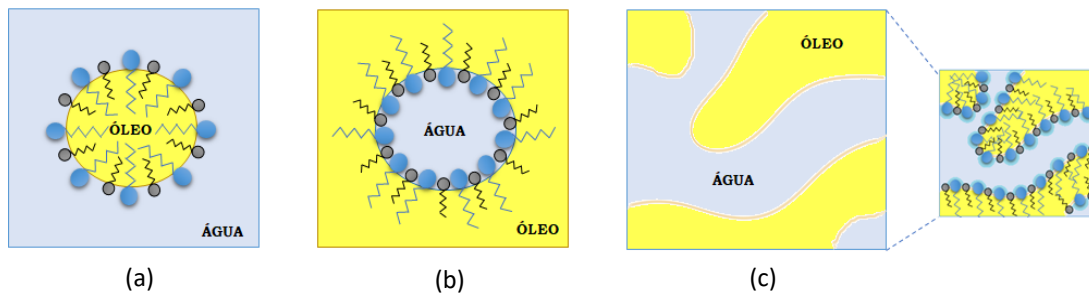
Apesar das macroemulsões, nanoemulsões e MEs consistirem em dispersões coloidais de um líquido no seio de outro líquido, há duas principais características físico-químicas que as diferem: a faixa de tamanho das suas gotículas e as características de estabilidade. As emulsões possuem um tamanho de gotícula acima de 500 nm e isso lhe confere uma textura semissólida

e uma aparência cremosa, por isso é considerada uma dispersão grosseira. Por outro lado, as gotículas das nanoemulsões variam entre 20 e 500 nm, apresentando-se com textura fluida e translúcida (permite a passagem de luz, porém, sem que se veja nitidamente o que está por trás de sua espessura) (PESHKOVSKY; PESHKOVSKY; BYSTRYAK, 2013), enquanto que as MEs possuem gotículas tão pequenas que variam entre 10 e 100 nm, o que proporciona a elas um aspecto visual transparente com uma textura bem fluida. Além disso, tanto as macroemulsões quanto as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, ou seja, seus sistemas tendem à separação de fases com o decorrer do tempo, ao passo que as MEs constituem sistemas termodinamicamente estáveis e este tipo de formulação oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, podendo ser utilizada por tempo muito mais amplo (OLIVEIRA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2016; NASTITI *et al.*, 2017).

A estabilidade termodinâmica das MEs está diretamente relacionada ao fato de haver um surfactante primário associado a um agente cotensativo em sua composição, o que propicia uma baixa tensão interfacial, bem como o pequeno tamanho de gotícula dessas formulações. É por este motivo que as MEs se formam espontaneamente (HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008). As nanoemulsões possuem estabilidade cinética e também requerem menor quantidade de surfactantes para sua formação do que as MEs, contudo, assim como as emulsões clássicas, para que seus sistemas se tornem estáveis, requerem métodos de preparo muito caros e necessitam da aplicação de grande quantidade de energia mecânica. Na prática, alguma entrada de energia na forma de mistura suave, agitação ou aquecimento facilita a formação de MEs, pois existem barreiras de energia cinética que devem ser superadas ou até limitações de transporte de massa que retardam sua formação (LOPES, 2014).

### **2.1.2 Tipos de Microemulsão**

As MEs são capazes de formar diferentes tipos de estruturas devido à mistura de água, óleo e tensoativos. Assim, além da natureza e da proporção entre todos estes componentes, a escolha adequada destas substâncias na formulação torna-se extremamente importante para a orientação desses sistemas (McCLEMENTES, 2012; FORMARIZ *et al.*, 2005). Há três tipos principais de MEs: a) óleo em água (O/A); b) água em óleo (A/O); ou c) bicontínuas (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Tipos de MEs: **a.** O/A; **b.** A/O; **c.** Estruturas bicontínuas. **Fontes:** Adaptado de Silva *et al.*, 2015 e de Souza Filho e Serra, 2015.

A representação mais simples da estrutura das MEs é a gotícula esférica, modelo no qual as gotículas de ME encontram-se envoltas por um filme interfacial, composto de moléculas de surfactantes e cossurfactantes capazes de isolar as fases líquidas presentes no sistema (KARASULU, 2008). Na estrutura do tipo O/A, a fase contínua ou externa é a água, enquanto a descontínua ou interna é o óleo, uma vez que moléculas lipossolúveis se situam no interior das gotículas de óleo no meio dispersante aquoso. Isto tende a acontecer, dentre outros fatores, pelo volume de cada fase e pelo tipo de tensoativo empregado. Quando há maior volume de água do que óleo no sistema, suas gotículas são designadas como “diretas”. Por outro lado, as MEs do tipo A/O se formam quando moléculas hidrossolúveis se situam no interior das gotículas de água que se encontram em um meio contínuo de óleo, logo, a fase aquosa é a interna ou descontínua, ao passo que o óleo compõe a fase externa ou contínua, já que o sistema possui maior quantidade de óleo em sua composição e, nesse caso, suas gotículas são ditas “inversas” (CONSTANTINIDES; YIV, 1995; BOONME, 2007; ROSSI *et al.*, 2007). Ambas as estruturas podem ser invertidas de A/O para O/A ou vice-versa quando se alteram as condições de emulsificação (MO; ZHONG; ZHONG, 2000).

As estruturas bicontínuas ou lamelares, por sua vez, não são constituídas por gotículas esféricas, mas, sim, por porções de água e óleo que coexistem como fases contínuas, separadas por uma camada interfacial flutuante e estabilizadas por altas concentrações de tensoativos e que pode ser regularmente contínua ou topologicamente caótica. Este tipo de sistema surge em decorrência principalmente da presença de quantidades equivalentes de água e óleo, mas também ocorre quando se aumenta gradativamente, por titulação, o volume da fase interna dos sistemas e frequentemente durante a transição de O/A para A/O ou de A/O para O/A. A grande vantagem da ME bicontínua está no fato de que sua estrutura possibilita sua aplicação como

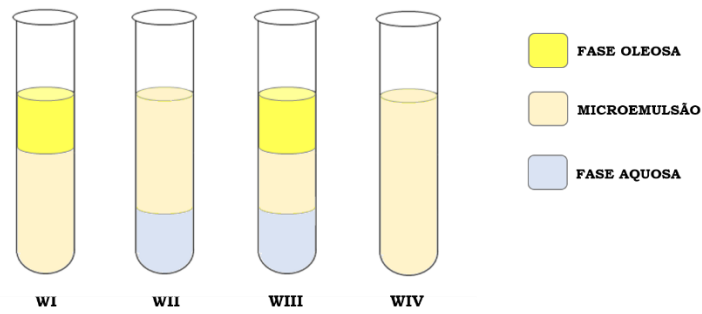


sistema transportador, tanto de fármacos hidro quanto lipossolúveis (LAWRENCE, 1994; D'CRUZ; UCKUN, 2001; BOONME, 2007; LOPES, 2014).

### 2.1.3 Classificação de Winsor

Winsor (1948) desenvolveu uma classificação capaz de mensurar o equilíbrio entre as características hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo em um sistema particular que se assemelha ao expresso pelo valor do EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo, cujo conceito será descrito mais a frente). O método, denominado Razão de Winsor (RW), pode ser modificado pela alteração da estrutura do tensoativo, pela adição de cotensoativos ou ajustando a temperatura do sistema. Sendo assim, Winsor estabeleceu quatro tipos de equilíbrio de fases (WINSOR, 1948; FORMARIZ *et al.*, 2005; FLANAGAN; SINGH, 2006; DAMASCENO *et al.*, 2011), conforme demonstra a Figura 2.2:

- *Winsor I (WI)*: sistema bifásico de ME O/A que está em equilíbrio com um excesso de fase oleosa na porção superior do sistema, devido à menor densidade do óleo em relação à da ME.
- *Winsor II (WII)*: sistema bifásico de ME A/O que está em equilíbrio com um excesso de fase aquosa na porção inferior do sistema, já que a densidade da água é maior que a da ME.
- *Winsor III (WIII)*: volumes iguais de fase oleosa e fase aquosa formam uma ME bicontínua que está em equilíbrio com um excesso de óleo na porção superior e de água na porção inferior de um sistema trifásico.
- *Winsor IV (WIV)*: neste sistema não há excesso de água e nem de óleo, tratando-se de uma ME homogênea e monofásica, que é o foco principal durante a preparação de um sistema microemulsionado.

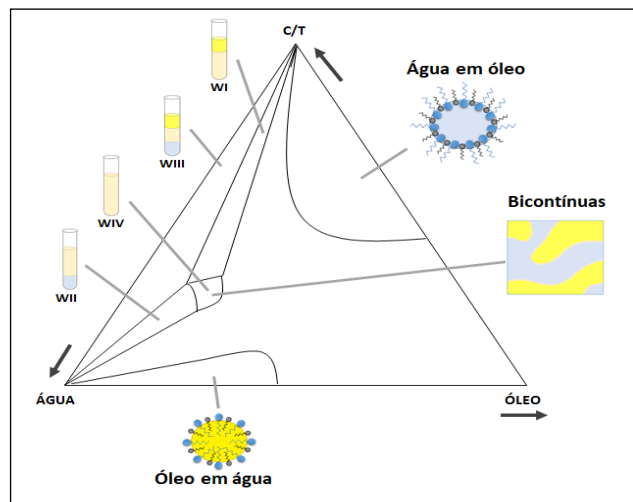


**Figura 2.2.** Ilustração demonstrando os tipos de sistema segundo a classificação de Winsor. **Fonte:** A autora.

### 2.1.4 Construção dos diagramas e delimitação da região de microemulsão

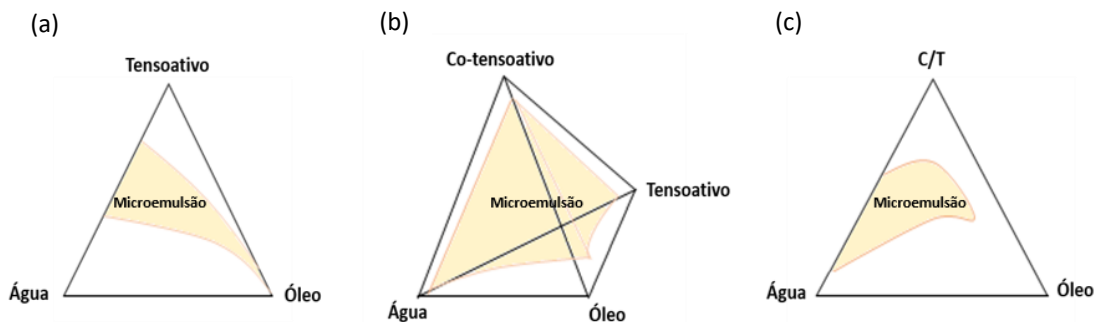
Sabe-se que as MEs são apenas uma das várias estruturas de associação que podem ser formadas quando se mistura óleo, água, surfactante e cotensoativo, sendo que a natureza química, a concentração dos componentes, a temperatura e a pressão também são fatores que influenciam na formação das variadas fases (BOONME, 2007).

Uma ferramenta útil para ilustrar as complexas séries de interações que ocorrem quando diferentes proporções dos componentes são misturadas é a construção de um diagrama de fases. Logo, o diagrama de fases descreve em que condição experimental é possível obter MEs e ainda delimita as regiões de transição entre emulsões, fases separadas e MEs O/A, A/O e bicontínuas, com o auxílio da classificação de Winsor (Figura 2.3) (OLIVEIRA *et al.*, 2004; LAWRENCE; REES, 2012).



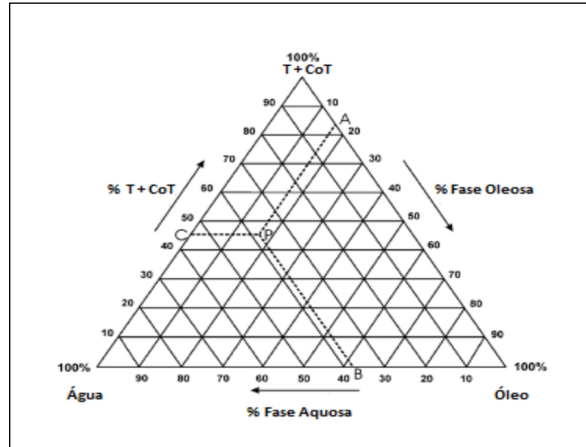
**Figura 2.3.** Diagrama ternário hipotético demonstrando esquematicamente regiões de MEs. **Fonte:** adaptado de Mehta e Kaur, 2011.

Para o preparo de MEs simples contendo óleo, água e tensoativo em sua composição, pode-se plotar o diagrama de fases como um diagrama triangular equilátero simples, conhecido como diagrama de fases ternário, onde cada vértice do diagrama representa 100% em peso de um componente em particular (BOONME, 2007) (Figura 2.4.a). Outro tipo de diagrama de fases é o quaternário, que consiste numa extensão de diagramas de fases ternários, mas, diferentemente destes, sua conformação espacial é dada em formato 3D e é formado por quatro constituintes: tensoativo, cotensoativo, fase oleosa e fase aquosa. Além disso, a representação deste diagrama é dada como um tetraedro, em que cada vértice corresponde a um dos componentes puros (Figura 2.4.b). Há ainda o diagrama pseudoternário, cujo sistema possui aspecto de diagrama ternário por também ser representado como um triângulo equilátero 2D, mesmo tendo quatro constituintes em sua composição, isto porque dois constituintes são agrupados como se fosse um só, de maneira que a relação água/tensoativo (A/T) ou cotensoativo/tensoativo (C/T) sejam constantes (Figura 2.4.c). A relação A/T costuma ser utilizada em estudos de difusão da luz, enquanto a relação tensoativo/cotensoativo é usada no estudo do comportamento de fases da ME a ser formada (ROSSI *et al.*, 2007).



**Figura 2.4.** Formação de regiões de ME em modelos de diagramas de fase. **a.** diagrama ternário; **b.** diagrama quaternário; **c.** diagrama pseudoternário. **Fonte:** adaptado de Rossi *et al.*, 2007.

Formulações microemulsionadas costumam ser desenvolvidas através de diagramas de fases pseudoternários, pois este tipo de modelo possibilita retratar a presença de água, óleo, tensoativo e cotensoativo e identificar os componentes mais apropriados, assim como suas proporções relativas para a obtenção de sistemas fisicamente estáveis ( FURLANETTO *et al.*, 2011). A Figura 2.5 demonstra como é feita a escolha de um ponto quando se deseja construir diagramas de fases pseudoternários para obtenção de regiões de ME.



**Figura 2.5.** Representação gráfica da construção de pontos de ME em um modelo de diagrama pseudoternário. **Fonte:** Oliveira *et al.*, 2017.

### 2.1.5 Fatores que afetam a região de microemulsão

A escolha de componentes para MEs farmacêuticas deve se pautar no equilíbrio entre compostos que sejam capazes de formar MEs, não sejam tóxicos e satisfaçam os requisitos de um bom veículo para a via de administração desejada. Avaliar as condições específicas e compreender a influência que alguns fatores exercem sobre as propriedades de seus constituintes também é algo fundamental para alcançar esse objetivo (KREILGAARD, 2002).

Embora não haja regras estritas à escolha dos componentes apropriados, há uma série de diretrizes gerais embasadas em observações empíricas. Um passo crucial está na escolha do surfactante e do cosurfactante para um determinado óleo (GHOSH; MURTHY, 2006). Tensoativos, também chamado de surfactantes, consistem em um tipo de molécula anfifílica, ou seja, possuem uma parte com característica apolar, que é solúvel em hidrocarbonetos, óleos e gorduras, ligada a uma outra parte com característica polar, que é solúvel em água (HOLMBERG; KRONBERG; LINDMAN, 2002; DALVIN, 2011). O tensoativo desempenha um papel importante na formação de MEs reduzindo a tensão interfacial em combinação com as contribuições entálpicas de interações reduzidas entre as caudas hidrofóbicas do surfactante e o solvente polar reduz a energia livre total do sistema, facilitando assim a formação de ME (FLANAGAN & SINGH, 2006). A classificação dos tensoativos é baseada na carga de seu grupo polar, que os divide em tensoativos aniônicos, catiônicos e não-iônicos (HOLMBERG; KRONBERG; LINDMAN, 2002).

Os tensoativos aniônicos são aqueles que se dissociam em íons carregados negativamente quando em solução aquosa e é justamente esta carga negativa que proporcionará sua capacidade emulsificante. Apesar de ser vantajoso pelo baixo custo, são restritos a preparações de uso externo devido à sua toxicidade. Os catiônicos, por outro lado, se dissociam formando cátions, quando em solução aquosa, e também são tóxicos, além de sua natureza catiônica possuir propriedade antisséptica que é muitas vezes aproveitada para formulações com esta finalidade. Tanto os tensoativos catiônicos quanto os aniônicos produzem emulsões ou MEs do tipo O/A que muitas vezes necessitam de um agente cotensoativo não-iônico para melhorar a estabilidade da formulação (AULTON, 2005; DALTIM, 2011). Os tensoativos não-iônicos por sua vez, não se dissociam em íons quando em solução aquosa e, por este motivo, são compatíveis com qualquer outro tipo de tensoativo (DALTIM, 2011), sendo capazes de estabilizar MEs tanto do tipo A/O quanto do tipo O/A. As vantagens particulares dos não-iônicos em relação aos outros são as baixas toxicidade e irritabilidade e, por isso, costumam ser utilizados em preparações orais e parenterais; possuem também maior grau de compatibilidade com diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos catiônicos e aniônicos, sendo ainda menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (AULTON, 2005).

A seleção dos tensoativos e cotensoativos pode ser feita empiricamente pelo método do EHL, que consiste em calcular a medida das contribuições relativas das regiões hidrófilas e lipófilas da molécula, ou seja, calcula as quantidades de tensoativos necessárias à produção de emulsões/MEs fisicamente mais estáveis para uma determinada combinação de óleo e água (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; AULTON, 2005). Portanto, a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu EHL (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Quando se trata da escolha do tensoativo adequado a um sistema microemulsionado, esta pode ser realizada com base no caráter hidrofílico do mesmo. Para a obtenção de uma ME do tipo A/O, o tensoativo de escolha deve ser mais hidrofóbico. Em contrapartida, um tensoativo de caráter hidrofílico possibilita a obtenção de MEs do tipo O/A (ROSSI *et al.*, 2007). Apesar do recurso do EHL, é difícil prever exatamente quais combinações de surfactante/cossurfactante e óleo serão capazes de produzir MEs. Além disso, este método falha por não prever a quantidade de tensoativo necessária à emulsificação, não considera os efeitos da temperatura, da presença de eletrólitos no meio e da contribuição dos outros constituintes, e apresenta limitações para os tensoativos iônicos (SILVA *et al.*, 2015). Daí a relevância da construção dos diagramas de fases para encontrar as regiões de ME.

O propósito de usar o agente cotensoativo é fazer com que a fluidez interfacial aumente, permitindo ao filme interfacial uma flexibilidade suficiente para absorver diferentes curvaturas necessárias à formação da ME numa vasta gama de composições. Ao adentrar nos espaços vazios entre as moléculas do filme surfactante, o cosurfactante cria um filme desordenado, porém mais preenchido, que reduz ainda mais a tensão interfacial e, assim, melhora a fluidez da interface. Para tanto, normalmente os álcoois de cadeia curta são os cotensoativos de escolha para compor as MEs, tendo em vista que a inclusão de alcoóis de comprimento de cadeia média limita o uso potencial da formulação, devido às suas propriedades tóxicas e irritantes (KARASULU, 2008; AZEEM *et al.*, 2009).

A fase oleosa deve ser escolhida apropriadamente, pois implica diretamente na seleção dos outros compostos para a ME. Deve-se considerar dois importantes fatores antes de selecionar a fase oleosa mais adequada: o potencial de solubilização do óleo para a substância e o óleo selecionado deve facilitar o aumento da região de formação de ME. Os óleos que possuem cadeias de hidrocarbonetos mais curtas são mais fáceis de microemulsificar quando em comparação aos óleos de cadeias longas, pois a capacidade de solubilizar grupos lipofílicos de um óleo é proporcional ao comprimento de sua cadeia (SAHU *et al.*, 2015).

Apesar da água purificada ser mais comumente usada como fase aquosa, esta pode conter ainda ingredientes ativos hidrofílicos e conservantes. O pH da fase aquosa precisa sempre ser ajustado, pois pode causar impacto considerável no comportamento de fase das MEs. Por este motivo, algumas soluções tampão são usadas como fase aquosa por alguns pesquisadores (KUMAR *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2014).

A temperatura geralmente exerce efeito sobre a formação e região de ME, pois o EHL dos surfactantes pode mudar com a temperatura e desestabilizar a interface do surfactante. Logo, é um parâmetro extremamente importante na determinação do tamanho efetivo da cabeça polar de surfactantes não-iônicos, pois, em baixa temperatura, eles são hidrofílicos e formam sistemas O/A, enquanto que em temperaturas mais altas, eles se tornam mais lipofílicos e formam sistemas A/O. Em uma temperatura intermediária, a ME coexiste com o excesso de água e com as fases oleosas e forma uma estrutura bicontínua. Portanto, a estabilidade da formulação da ME final deve sempre ser avaliada dentro das faixas de temperatura de armazenamento e aplicação (KARASULU, 2008; SINGH *et al.*, 2011).

Portanto, ao se planejar o desenvolvimento de uma ME, vários parâmetros precisam ser bem avaliados de antemão para se obter a melhor formulação, tendo em vista a própria escolha

da composição dos constituintes, em que se deve atentar para: o cuidado de optar por tensoativos que não apresentem risco de toxicidade; verificar qual a razão C/T ideal entre eles; a escolha das fases oleosa e aquosa, que devem ser direcionadas conforme a via de administração pretendida, podendo-se lançar mão de fase oleosa sintética, óleos fixos ou essenciais, ou, no caso da incorporação de fármacos, deve-se atentar para a solubilidade do mesmos.

## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Teste de miscibilidade e seleção dos componentes

A miscibilidade dos óleos essenciais com os demais componentes da formulação (Quadro 2.2) foi acessada em um ensaio realizado em duas etapas:

1ª) *Gotejamento dos óleos essenciais nos insumos (teor de óleo essencial variando de 1% até 50% da mistura)*: primeiramente, pesou-se 0,5g de cada insumo em um tubo de ensaio contendo uma barra magnética. Depois, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, fez-se a adição gota à gota do óleo essencial em cada tubo, agitando-se a cada adição, até que o volume da mistura atingisse uma proporção de 1:1 (0,5g de solvente: 0,5g de óleo) ou até que houvesse separação entre as substâncias, indicando que em tal proporção o insumo deixava de ser miscível no óleo. Ao final de cada etapa, as amostras foram submetidas à centrifugação a 3500 rpm por cerca de 1 a 5 minutos para confirmar se não haveria separação de fases.

2ª) *Gotejamento dos insumos nos óleos essenciais (teor de óleo essencial variando de 100% até 50% da mistura)*: nesta etapa fez-se o procedimento inverso, pesando-se 0,5g dos óleos essenciais e gotejando-os com cada um dos insumos, até que o volume da mistura atingisse uma proporção de 1:1 (0,5g de solvente: 0,5g de óleo) ou antes, caso houvesse visualização de separação entre as substâncias. Foram considerados miscíveis os sistemas que não apresentaram separação de fases após serem submetidos à centrifugação a 3500 rpm por cerca de 1 a 5 minutos.

**Quadro 2.2.** Insumos estudados para compor as MEs.

CLASSIFICAÇÃO	INSUMOS	FORNECEDOR
Fase Oleosa	Ácido Oleico (AO)	SIGMA-ALDRICH®
	Miristato de Isopropila (MI)	
Tensoativo	Kolliphor® EL (KEL)	SIGMA-ALDRICH®
	Tween® 80 (TW80)	OPÇÃO FÊNIX
	Tween® 20 (TW20)	VETEC
Cotensoativo	Transcutol® P (TOLP)	SIGMA-ALDRICH®
	Propilenoglicol 400 (PG)	PROQUÍMIOS®
	Álcool Etilico (AE)	BIOTEC®
	Álcool Isopropílico (AI)	PROQUÍMIOS®



### 2.2.2 Construção dos diagramas

Para a construção dos diagramas de fases pseudoternários foram estudadas as variações entre tensoativos (KEL, TW80 e TW20), cotensoativos (AE, AI, PG e TOLP) e fases oleosas (AO e MI).

Para a delimitação de cada região de Winsor, foram preparados pontos em tubos de ensaio contendo um agitador magnético e massas pré-determinadas de tensoativo (T), cotensoativo (C) e óleo, pesadas em balança analítica, conforme a proporção adotada em cada ponto (Tabela 2.1). Em seguida, gotas de água destilada foram tituladas dentro do tubo até que o sistema passasse de límpido para turvo, sinalizando a saída da região de ME. Em seguida, o tubo de ensaio era submetido à centrifugação (CENTRIBIO®80-2B) por cerca de 10 a 30 minutos a 3500 rpm para visualizar a ocorrência ou não de separação de fases e classificar o novo equilíbrio de acordo com a classificação de Winsor. O percentual de cada componente ao final das titulações foi calculado para cada ponto e a plotagem dos pontos foi realizada com o auxílio do software Origin 6.0.

**Tabela 2.1.** Proporção pré-estabelecida entre os componentes antes da titulação, considerando a razão C/T de 1:1.

Ponto	C/T	C (g)	T (g)	Óleo (g)	Total	
1	100 %	0,5	0,5	0 %	0 g	1g
2	90 %	0,45	0,45	10 %	0,1 g	1g
3	80 %	0,40	0,40	20 %	0,2 g	1g
4	70 %	0,35	0,35	30 %	0,3 g	1g
5	60 %	0,30	0,30	40 %	0,4 g	1g
6	50 %	0,25	0,25	50 %	0,5 g	1g
7	40 %	0,20	0,20	60 %	0,6 g	1g
8	30 %	0,15	0,15	70 %	0,7 g	1g
9	20 %	0,10	0,10	80 %	0,8 g	1g
10	10 %	0,05	0,05	90 %	0,9 g	1g
11	5 %	0,025	0,025	95 %	0,95 g	1g
12	0 %	0	0	100 %	1	1g

### 2.2.3 Incorporação dos óleos essenciais nas microemulsões

Pontos contendo 5% de fase oleosa (ácido oleico e miristato de isopropila) em sua composição, foram selecionados para o preparo das “formulações bases” referentes ao Diagrama 1. Em seguida, foram estabelecidas, para os outros Diagramas (2 ao 10), proporções

de combinação entre ácido oleico e óleo essencial até que este último pudesse substituir completamente o ácido oleico nas formulações bases formadas e compor inteiramente a fase oleosa de cada uma delas.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Teste de miscibilidade

Segundo a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2016), o termo miscível é empregado para descrever um líquido ou gás que produza uma mistura homogênea ao ser misturado em qualquer proporção com o solvente indicado no mesmo estado físico. A execução deste teste partiu deste princípio conceitual de miscibilidade, propondo verificar todas as proporções possíveis em que as substâncias testadas se dissolvessem nos óleos essenciais selecionados. Além disso, o estudo prévio da miscibilidade é importante, pois aumenta o sucesso de obtenção de regiões microemulsionadas quando os componentes forem misturados na proporção correta.

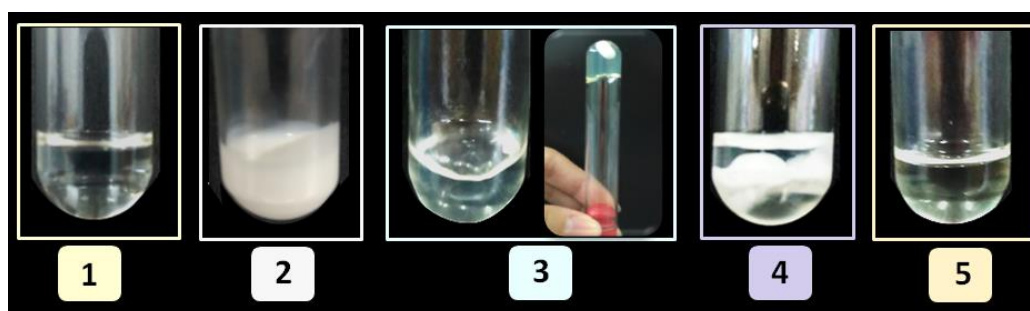
O Quadro 2.3 demonstra os resultados observados do teste para cada óleo essencial, verificando-se que tanto o óleo essencial de *M. officinalis* quanto o de *C. citratus* foram miscíveis (em todas as proporções) em todos os insumos testados, à exceção do propilenoglicol, no qual os óleos não apresentaram nenhuma miscibilidade. Por essa razão, o propilenoglicol foi descartado e não foi empregado como cotensoativo no desenvolvimento dos diagramas de fases.

**Quadro 2.3.** Teste de miscibilidade dos óleos de erva-cidreira e capim-limão com os demais constituintes das MEs.

Insumo	Aspecto da mistura gerada	
	<i>Melissa Officinalis</i> L.	<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf
Ácido oleico	Homogêneo	Homogêneo
Miristato de isopropila		
Kolliphor® El		
Transcutol® P		
Tween® 20		
Tween® 80		
Álcool isopropílico		
Álcool etílico		
Propilenoglicol	Bifásico	Bifásico

### 2.3.2 Construção dos diagramas de fases

As MEs, dentro de um sistema, podem se formar em várias combinações entre os constituintes, principalmente quando a quantidade de tensoativos for elevada. Por isso, é importante determinar a região em que as MEs se formam dentro dos diagramas pseudoternários (TENJARLA, 1999). Além das regiões microemulsionadas (WIV), foram delimitadas outras regiões que correspondem a áreas de WII, gel, emulsão clássica e a uma região onde havia total separação dos constituintes que foi denominada de O + A + C/T (óleo + água + cotensoativo/tensoativo). A Figura 2.6 mostra as diferentes fases formadas nos diagramas. O Quadro 2.4 descreve todos os sistemas estudados, cujos diagramas encontram-se representados pelas Figuras 2.7 a 2.10. Para todos os diagramas, adotou-se a razão C/T de 1:1.

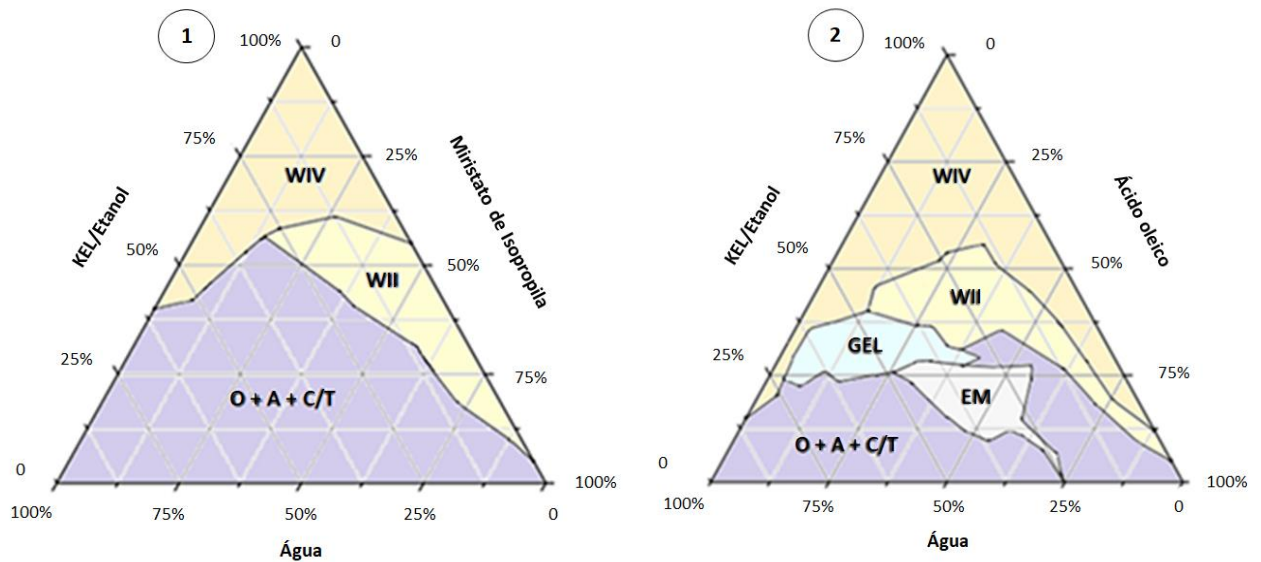


**Figura 2.6.** Fotografias ilustrando todas as fases formadas. **1.** WII; **2.** Emulsão clássica; **3.** Gel; **4.** Separação dos constituintes (O + A + C/T); **5.** ME (WIV). **Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Quadro 2.4.** Composição estudada em cada diagrama.

Diagrama	Cotenoativo	Tensoativo	Fase Oleosa
1	Álcool etílico	Kolliphor® EL	Miristato de isopropila
2	Álcool etílico	Kolliphor® EL	Ácido oleico
3	Álcool isopropílico		
4	Transcutol® P		
5	Álcool etílico	Tween® 80	
6	Álcool isopropílico		
7	Transcutol® P		
8	Álcool etílico	Tween® 20	
9	Álcool isopropílico		
10	Transcutol® P		

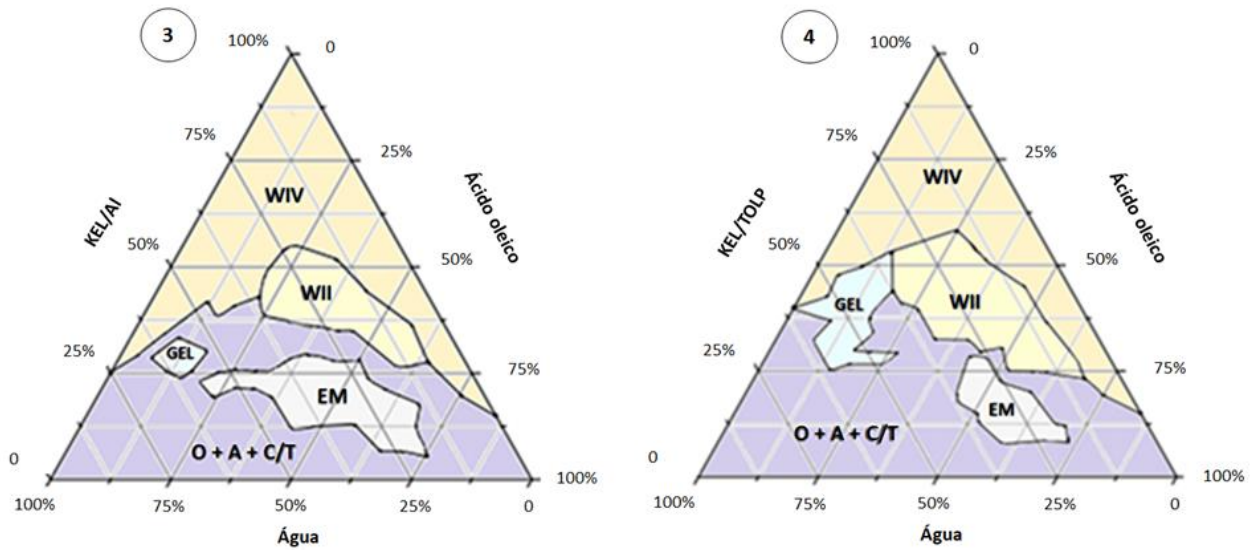
Os Diagramas 1 e 2 (Figura 2.7) foram construídos com os mesmos componentes, exceto pela fase oleosa, que é miristato de isopropila no primeiro e ácido oleico no segundo. Observe-se que o Diagrama 2 apresentou uma região de WIV muito maior em relação ao Diagrama 1, comprovando que o ácido oleico é capaz de gerar uma área de ME muito maior do que o miristato de isopropila. Além disso, houve formação de regiões de WII em ambos os sistemas, entretanto, no Diagrama 2, foram visualizadas regiões de emulsão clássica e gel (estas regiões serão discutidas adiante), além da diminuição da área onde nenhum sistema emulsionado foi encontrado (O + A + C/T). Por essa razão, o miristato de isopropila foi preterido e os demais diagramas foram construídos empregando apenas o ácido oleico como fase oleosa.



**Figura 2.7.** Ilustração demonstrando a composição e as fases dos Diagramas 1 e 2. **Diagrama 1:** fase oleosa = miristato de isopropila; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor® EL; cotensoativo = etanol. **Diagrama 2:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor® EL; cotensoativo = etanol. **Fases formadas:** WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.

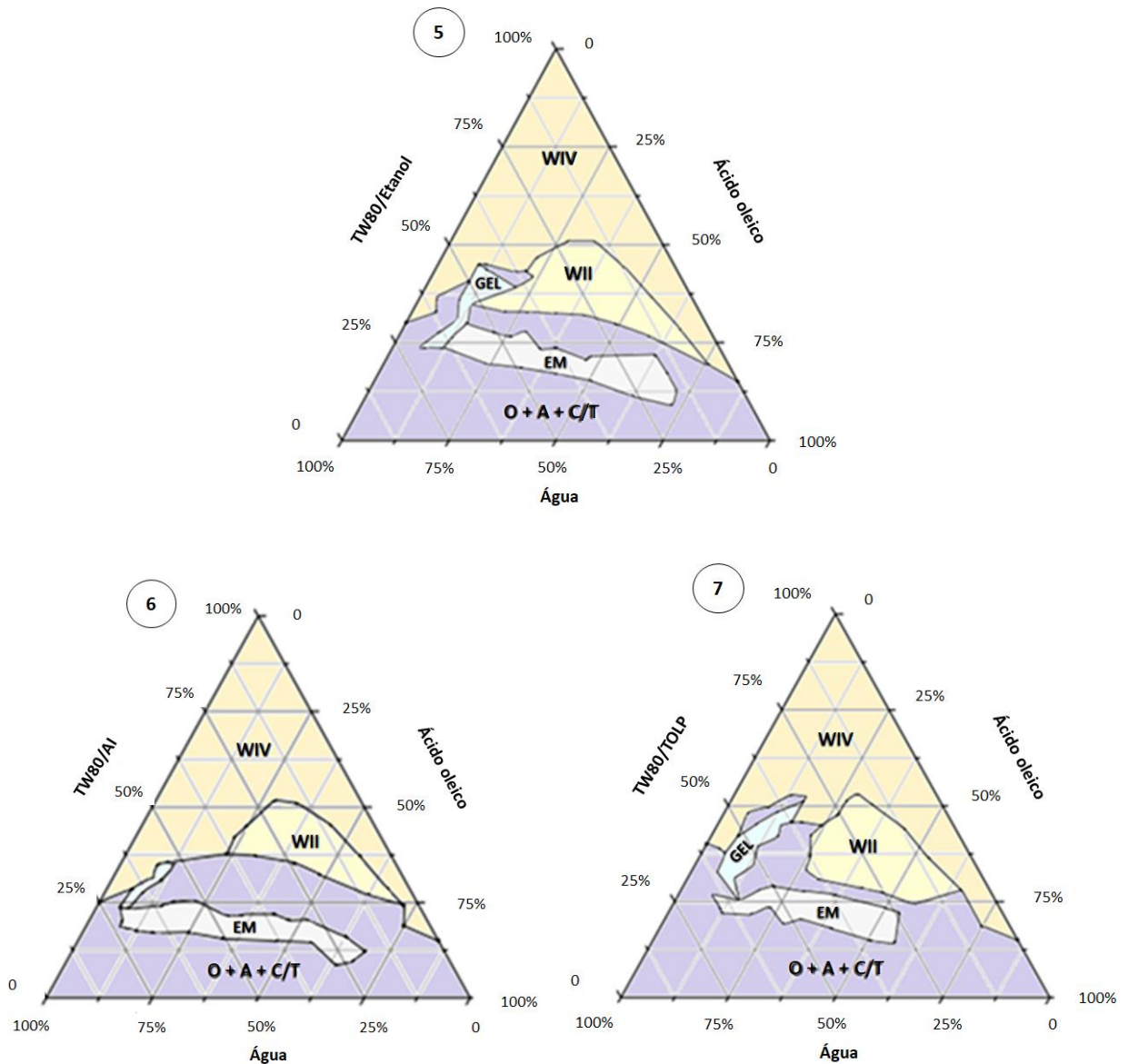
Comparando-se o Diagrama 2 (Figura 2.7) com os Diagramas 3 e 4 (Figura 2.8) pode-se inferir sobre a interferência do cotensoativo, visto que os demais componentes (água, tensoativo e fase oleosa) são os mesmos (Quadro 2.4).

Quando o Kolliphor® EL é empregado como tensoativo, o uso de Transcutol® P como cotensoativo (Diagrama 4) gerou a menor área de ME, ao passo que o etanol e o álcool isopropílico produziram regiões maiores, porém semelhantes. Por isso, para a construção dos próximos diagramas, optou-se por trocar de tensoativo, mas manter o teste com os 3 cotensoativos (etanol, isopropanol e Transcutol® P).

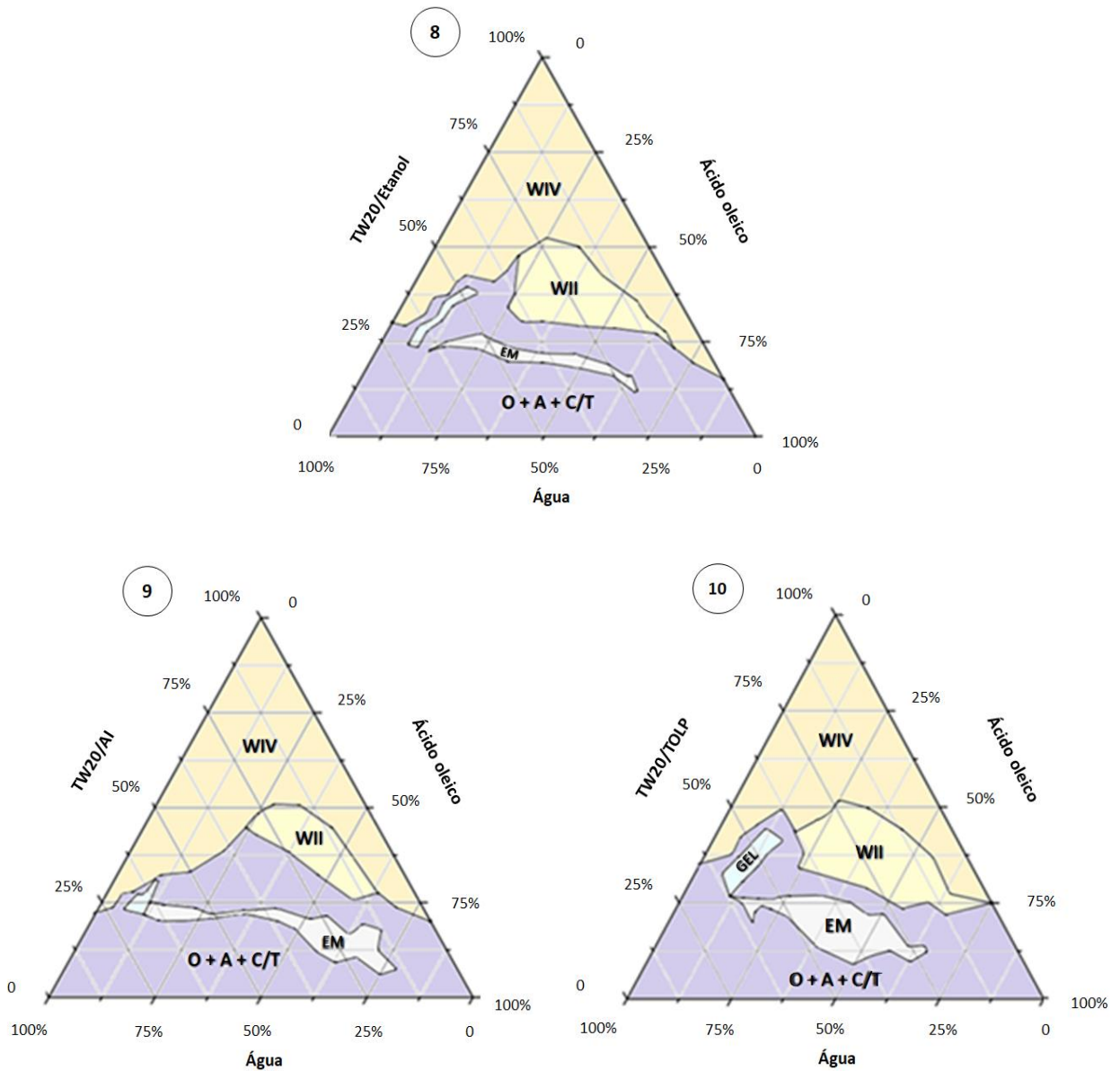


**Figura 2.8.** Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 3 e 4. **Diagrama 3:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor<sup>®</sup> EL; cotensoativo = álcool isopropílico. **Diagrama 4:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Kolliphor<sup>®</sup> EL; cotensoativo = Transcutol<sup>®</sup> P. **Fases formadas:** WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.

Comparando-se os Diagramas da Figura 2.9 (Tween<sup>®</sup> 80 como tensoativo) com os da Figura 2.8 (Kolliphor<sup>®</sup> EL como tensoativo), e guardando-se, ainda, a devida equivalência entre cada cotensoativo (comparar as duplas de diagramas: 2 com 5, 3 com 6 e 4 com 7), nota-se que houve alteração do tamanho e ocorrência das regiões de WII, emulsão clássica e gel. Na área das MEs, que é a região de interesse neste estudo, não houve grandes alterações e, por isso, qualquer discussão sobre vantagem e desvantagem de uma sobre a outra só será contemplada no tópico 4.1.1, após a caracterização físico-química de cada uma delas. O mesmo pode ser dito após comparação dos Diagramas da Figura 2.10 (Tween<sup>®</sup> 20 como tensoativo), visto que houve alterações significativas na disposição e nas áreas das regiões, exceto para a área de ME, que continuam semelhantes entre si, quando respeitada a comparação apenas entre os diagramas com o mesmo cotensoativo (comparar os trios de diagramas: 2 com 5 e 8; 3 com 6 e 9; 4 com 7 e 10).



**Figura 2.9.** Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 5, 6 e 7. **Diagrama 5:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween<sup>®</sup> 80; cotensoativo = etanol. **Diagrama 6:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween<sup>®</sup> 80; cotensoativo = álcool isopropílico. **Diagrama 7:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween<sup>®</sup> 80; cotensoativo = Transcutol<sup>®</sup> P. **Fases formadas:** WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.



**Figura 2.10.** Ilustração demonstrando a composição e as fases dos diagramas 8, 9 e 10. **Diagrama 8:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween® 20; cotensoativo = etanol. **Diagrama 9:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween® 20; cotensoativo = álcool isopropílico. **Diagrama 10:** fase oleosa = ácido oleico; fase aquosa = água; tensoativo = Tween® 20; cotensoativo = Transcutol® P. **Fases formadas:** WII, WIV, gel, emulsão clássica e O + A + C/T.



À exceção do Diagrama 1, que usou miristato de isopropila como fase oleosa, todos os outros nove diagramas, que tiveram como fase oleosa o ácido oleico, formaram regiões de géis e emulsões clássicas.

A formação da fase gel está relacionada à estrutura molecular do ácido oleico. Comelles, Sánchez-leal e González (2005), em um estudo que avaliou a influência da estrutura de ácidos graxos na formação de géis transparentes com estrutura de cristal líquido lamelar a partir de sistemas compostos por um surfactante aniônico (éter oleil fosfatado 3 EO), ácidos graxos, éter etílico de dietilenoglicol e água, constataram que géis transparentes de cristal líquido somente podem ser preparados com ácidos graxos insaturados, pois as suas condições de formação estão intimamente relacionadas com a sua estrutura molecular. Ao comparar os ácidos palmitoleico e oleico, ambos com uma ligação dupla, mas com cadeias alquila C16 e C18, respectivamente, diferenças notáveis foram observadas, enquanto que na comparação entre os ácidos oleico e linoleico, ambos com o mesmo número de átomos de carbono na cadeia alquílica, mas com diferentes graus de insaturação (uma e duas ligações duplas, respectivamente), as diferenças não foram significativas. Dessa forma, ficou evidenciado que o fator predominante para a formação de géis é o comprimento da cadeia de carbono e não o seu grau de insaturação. Outra questão importante observada neste estudo foi que a formação do cristal líquido não era possível na ausência de alguns dos quatro componentes (surfactante, ácido graxo, glicol ou água), sendo todos eles indispensáveis para formar as estruturas de cristal líquido monofásico. Os autores ainda afirmam que o excesso ou a falta de qualquer um desses componentes levará a uma separação de fases.

Somado a isto, pode-se dizer que, outro fator capaz de contribuir junto ao ácido oleico para a formação de gel é a própria quantidade de cotensoativos e tensoativos da formulação (razão C/T). Segundo Muzaffar, Singh e Chauhan (2013), um outro importante papel dos cotensoativos é destruir as estruturas cristalinas líquidas ou gelificadas que poderiam prevenir a formação de ME. Daltin (2011) afirma que isto ocorre devido ao caráter anfifílico dos cotensoativos, que faz com que eles sejam conduzidos para a região entre as moléculas de tensoativo, onde causam uma desordem na mistura de tensoativo e água nas interfaces. Além disso, visto que a associação entre as moléculas de tensoativos, em particular as espécies iônicas, contribui para a formação de géis, então, misturar diferentes tipos de surfactentes faz com que as partes distintas de suas moléculas não encontrem um bom encaixe em conjunto como estruturas organizadas (géis) e isso é reforçado também pela desordem geométrica promovida pelos cotensoativos.

### 2.3.3 Seleção das microemulsões

Para a seleção das MEs, optou-se por escolher pontos dentro da área de ME de cada um dos diagramas para gerar gotículas do tipo O/A (de forma que os óleos ficassem na fase interna das gotículas, protegidos contra oxidação e volatilização) e com o menor teor possível de tensoativos (para baratear o custo do produto). Para a fase oleosa, foi padronizado um percentual de 5% em todas as formulações para favorecer o estudo comparativo da atividade antifúngica, que será apresentada e discutida no próximo capítulo. Cada diagrama gerou uma formulação, que foram nomeadas de pontos A a I, conforme demonstra a Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Composição dos pontos selecionados dentro das regiões de ME de cada um dos dez diagramas pseudoternários.

Diagrama	Ponto	Composição				
		Tensoativo	Cotensoativo	Razão C/T	Fase aquosa (água)	Fase oleosa (ác. oleico)
2	A	Kolliphor® EL	Álcool Etílico	45%	50%	5%
3	B	Kolliphor® EL	Álcool Isopropílico	40%	55%	5%
4	C	Kolliphor® EL	Transcutol®P	55%	40%	5%
5	D	Tween® 80	Álcool Etílico	45%	50%	5%
6	E	Tween® 80	Álcool Isopropílico	33%	62%	5%
7	F	Tween® 80	Transcutol®P	55%	40%	5%
8	G	Tween® 20	Álcool Etílico	40%	55%	5%
9	H	Tween® 20	Álcool Isopropílico	35%	60%	5%
10	I	Tween® 20	Transcutol®P	50%	45%	5%

Pode-se observar que os pontos G, H e I foram os que apresentaram menor teor de C/T e, por essa razão, foram selecionados para a etapa seguinte de incorporação dos óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus*. Para não deixar de testar o comportamento das MEs contendo outros tensoativos, escolheu-se para seguir também o ponto B (com Kolliphor® EL) e ponto E (com Tween® 80), ambos com álcool isopropílico como cotensoativo, pois foram os que exigiram menor teor de C/T para a formação das MEs.

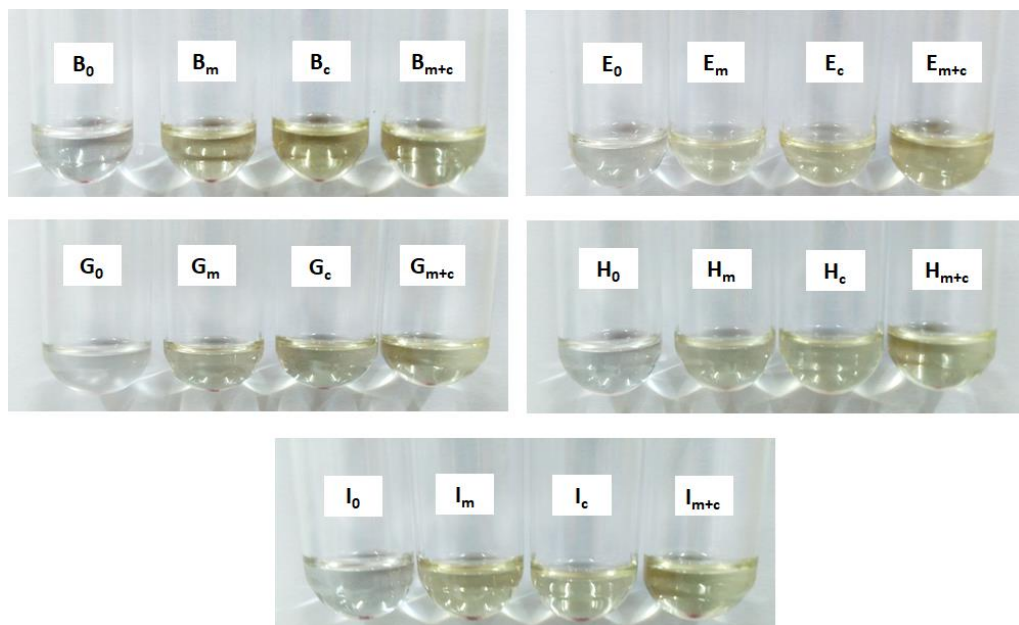
### 2.3.4 Incorporação dos óleos essenciais nas microemulsões

A incorporação dos óleos essenciais foi realizada em sua totalidade, ou seja, foi possível realizar a substituição por completo do ácido oleico nas formulações base (0), tanto pelo óleo

essencial de *M. officinalis* (m) quanto pelo óleo de *C. citratus* (c), sendo que as formulações passaram a conter 5% de cada óleo essencial ou 2,5% de cada óleo, quando estes foram combinados em uma mistura 1:1 como fase oleosa. Com base nisso, foram preparadas quinze MEs, dentre as quais cinco continham óleo essencial de *M. officinalis*, outras cinco continham óleo essencial de *C. citratus* e as últimas cinco tiveram como fase oleosa a mistura 1:1 de ambos os óleos. A Tabela 2.3 demonstra a concentração dos componentes de todas essas formulações.

Após a incorporação, percebeu-se que as formulações permaneceram com suas características macroscópicas de transparência e fluidez características das MEs, porém o aroma dos óleos essenciais prevaleceu sobre os odores dos surfactantes e suas colorações foram alteradas devido ao aspecto amarelado dos óleos essenciais, conforme mostra a Figura 2.11.

Essas formulações foram encaminhadas para o teste de atividade antifúngica contra os fungos *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, o que será discutido no próximo capítulo. As formulações mais ativas no teste de susceptibilidade antifúngica serão caracterizadas em ensaios físico-químicos e de citotoxicidade, discutidos no Capítulo 4.



**Figura 2.11.** Fotografias das formulações bases e com óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus* incorporados a 5% como fase oleosa. **Fonte:** Arquivo pessoal da autora.

**Tabela 2.3.** Composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus* incorporados como fases oleosas.

Amostra	Fase Oleosa		Cotenssoativo	Tensoativo	Fase Aquosa
<b>B<sub>0</sub></b>	ácido oleico 5%		álcool isopropílico 20%	Kolliphor® EL 20%	Água 55%
<b>B<sub>m</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>B<sub>c</sub></b>	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>B<sub>m+c</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>E<sub>0</sub></b>	ácido oleico 5%		álcool isopropílico 16,5%	Tween® 80 16,5%	Água 62%
<b>E<sub>m</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>E<sub>c</sub></b>	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>E<sub>m+c</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>G<sub>0</sub></b>	ácido oleico 5%		álcool etílico 20%	Tween® 20 20%	Água 55%
<b>G<sub>m</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>G<sub>c</sub></b>	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>G<sub>m+c</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>H<sub>0</sub></b>	ácido oleico 5%		álcool isopropílico 17,5%	Tween® 20 35%	Água 60%
<b>H<sub>m</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>H<sub>c</sub></b>	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>H<sub>m+c</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>I<sub>0</sub></b>	ácido oleico 5%		Transcutol® P 25%	Tween® 20 25%	Água 45%
<b>I<sub>m</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>I<sub>c</sub></b>	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>I<sub>m+c</sub></b>	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			

## 2.4 REFERÊNCIAS

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 353-354p.

AZEEM, A.; KHAN, Z. I.; AQIL, M.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; TALEGAONKAR, S. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 5, p. 525-547, 2009.

BOONME, P. Applications of microemulsions in cosmetics. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 4, p. 223-228, 2007.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Primeiro Suplemento**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. 17p.

COMELLES, F.; SÁNCHEZ-LEAL, J.; GONZÁLEZ, J. J. Influence of fatty acid structure on liquid crystal formation in systems with anionic surfactant, diethyleneglycol ethylether and water. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n.5, p. 291-296, 2005.

CONSTANTINIDES P. P.; YIV, S. H. Particle-size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage-conditions. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 2, p. 225-234, 1995.

D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, n. 2, p. 113-123, 2001.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedade e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011. 46p-206p.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n.3, p. 221-237, 2006.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 362p.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FURLANETTO, S.; CIRRIA, M.; PIEPELB, G.; MENNINIA, N.; MURA, P. Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 610-617, 2011.

GHOSH, P. K.; MURTHY, R. S. R. Microemulsions: A potential drug delivery system. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 167-180, 2006.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions - modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, p. 603-631, 2008.

HOLMBERG, K.; BO, J.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. 2a ed. England: John Wiley & Sons, 2002. 3-4p.

KARASULU, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 1, p. 119-135, 2008.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supl. 1, p. 77-98, 2002.

KUMAR, K. S.; DHACHINAMOORTHY, D.; SARAVANAN, R.; GOPAL, U.; SHANMUGAM, V. Microemulsions as carrier for novel drug delivery: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 10, n. 2, p. 37-45, 2011.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.19, n. 3, p. 257-269, 1994.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 175-193, 2012.

LOPES, L. B. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. **Pharmaceutics**, v. 6, n.1, p. 52-77, 2014.

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

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions: thermodynamic and dynamic properties. In: Tadashi, M. **Thermodynamics**. InTechOpen, p. 381-406, 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/thermodynamics/microemulsions-thermodynamic-and-dynamic-properties>> Acesso em: 22 set 2017.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + *n*-heptane + *n*-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 493, n. 1-2, p. 100-107, 2000.

MUZAFFAR, F.; SINGH, U. K.; CHAUHAN, L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 39-53, 2013.

NASTITI, C. M. R. R.; PONTO, T.; ABD, E.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S. Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 1-25, 2017.

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

OLIVEIRA, J. L. B.; NÓBREGA, G. A. S.; SANTOS, F. K. G.; GOMES, D. A. A. Influência da razão C/T e salinidade da fase aquosa em sistemas microemulsionados com OCS-Butanol-água-querosene. **Holos**, Ano 33, v. 4, p. 235-248, 2017.

PESHKOVSKY, A. S.; PESHKOVSKY, S. L.; BYSTRYAK, S. Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 69, p. 77-82, 2013.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2007.

SAHU, G. K.; SHARMA, H.; GUPTA, A.; KAUR, C. D. Advancements in microemulsion based drug delivery systems for better therapeutic effects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 1, p. 8-15, 2015.

SAINI, J. K.; NAUTIYAL, U.; KUMAR, S.; SINGH, D.; ANWAR, F. Microemulsions: a potential novel drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2014.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S. ; BÖCKEL, W. J. ; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SINGH, V.; BUSHETTII, S. S.; RAJU, A. S.; AHMAD, R.; SINGH, M.; BISHT, A. Microemulsions as promising delivery systems: a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Research and education**, v. 45, n. 4, p. 392–401, 2011.

SOUSA FILHO, P. C.; SERRA, O. A. Liquid phase synthesis methodologies for the obtainment of rare earth-based inorganic nanomaterials. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 679-696, 2015.

TENJARLA, S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. **Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.16, n. 5, p. 461-521, 1999.

WINSOR, P.A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 44, p. 376-398, 1948.

ZHANG, H.; CUI, Y.; ZHU, S.; FENG, F.; ZHENG, X. Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 154-160, 2010.

# **CAPÍTULO 3**



## **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS MICROEMULSÕES**

### **3.1 REVISÃO DE LITERATURA**

As formas farmacêuticas convencionais normalmente não são capazes de fazer com que substâncias farmacologicamente ativas alcancem concentração considerável no tecido alvo do organismo, pois, entre o local de administração e o sítio onde deve exercer seu efeito farmacológico, há inúmeras barreiras biológicas que submetem os tecidos aos efeitos iminentemente tóxicos dos fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2004; CONSTANTINIDES, 1995). Pensando nisso, ao longo dos anos, pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de investigar a viabilidade do uso das MEs como veículos para o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação e liberação de fármacos (VANDAMME, 2002).

A formulação microemulsionada tem obtido grande notoriedade na área farmacêutica, devido à sua capacidade de melhorar a eficácia terapêutica dos fármacos, pois possibilita a taxa controlada de liberação da mesma, retardando, assim, a sua degradação, além de minimizar os efeitos colaterais tóxicos do fármaco, por sua especificidade de alvo (JADHAV *et al.*, 2006; MISHRA; PANOLA; RANA, 2014).

As propriedades específicas dos sistemas microemulsionados estão relacionadas principalmente à sua grande área interfacial com baixa tensão, ao pequeno tamanho de gotículas, à baixa viscosidade e ao alto poder de solubilização para fármacos lipofílicos, hidrofílicos e anfifílicos (GUIMARÃES *et al.*, 2014). Um grande atrativo à indústria farmacêutica está na capacidade das MEs de solubilizar substâncias hidrofílicas e lipofílicas simultaneamente, fator ocasionado pela presença dos tensoativos, que aumentam a permeabilidade da membrana celular, facilitando a absorção do fármaco e possibilitando melhor biodisponibilidade do mesmo (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; MISHRA; PANOLA; RANA, 2014).

Ademais, em virtude da formação espontânea desses sistemas, fatores como intensidade e duração da agitação, temperatura, tempo de emulsificação, dentre outros, podem ser evitados, sendo possível, também, a esterilização por filtração por conta de sua baixa viscosidade. Do ponto de vista econômico, o uso de baixa quantidade de energia e de materiais de baixo custo reduzem o custo de produção destes sistemas. Sendo assim, particularidades como estas tornam

as MEs bastante vantajosas do ponto de vista da produção farmacêutica (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2018).

O tratamento de infecções fúngicas por formas de dosagem tópicas apresenta algumas características vantajosas em relação às vias de administração sistêmicas, tais como a possibilidade de ação no local de aplicação, a redução do risco de efeitos secundários a nível sistêmico, o aumento da eficácia da terapia e a sua aceitação pelos pacientes. O uso de MEs também pode aumentar a ação local ou sistêmica de medicamentos por diferentes mecanismos, representando assim uma promissora alternativa à veiculação de antifúngicos tópicos (JADHAV; SHETYE; KADAM, 2010). No caso das onicomicoses, a infecção fúngica da unha poderia ser tratada mais facilmente se uma formulação fosse aplicada na cavidade ungueal, onde permaneceria por um período de tempo suficientemente capaz de fazer com que o medicamento penetrasse no leito e na placa ungueais para combater o fungo causador da doença. Este feito seria totalmente possível se o fármaco antifúngico fosse carregado num transportador coloidal de aplicação tópica (BAROT *et al.*, 2012).

Como já mencionado no Capítulo 1, os óleos essenciais são misturas complexas que possuem compostos de diferentes naturezas químicas. Alguns deles têm atividades fisiológicas ou terapêuticas, podendo agir sozinhos ou em sinergia e, por conta disto, são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia e cosmética. Atualmente, o interesse em óleos naturais bioativos tem se intensificado principalmente devido às evidências que revelam seu potencial em prevenir e tratar numerosas doenças humanas. (XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2017). Contudo, a sua baixa solubilidade e estabilidade em água, somado à sua alta volatilidade e efeitos colaterais associados ao seu uso limitaram sua aplicação medicinal. As micromeulsões são uma interessante ferramenta para solucionar tais dificuldades, pois são capazes de assegurar o aumento da estabilidade química destes óleos na presença de ar, luz, umidade e altas temperaturas, fatores que podem levar à rápida evaporação e à degradação dos compostos ativos (BILIA *et al.*, 2014).

Em relação às MEs contendo óleos essenciais e que visam a atividade antifúngica ou o tratamento de onicomicoses, a literatura demonstra que esse tipo de estudo é bastante escasso, tendo em vista que a maioria das pesquisas estão direcionadas à atividade antibacteriana dessas formulações para aplicação na indústria alimentícia e, além disso, geralmente as nanoemulsões são os veículos de escolha para incorporação destes óleos. A Tabela 3.1 demonstra alguns desses estudos.

**Tabela 3.1.** Relação de alguns estudos que realizaram o desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana de MEs e outras dispersões coloidais contendo óleos essenciais.

Formulação	Óleo essencial (espécies)	Microrganismo testado	Aplicação (indústria)	Autores
Microemulsão e emulsão	<i>Allium sativum</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella typhimurum</i>	Alimentícia	El-Sayed <i>et al.</i> , 2017
Nanoemulsões e nanocapsulas	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>T. rubrum</i>	Farmacêutica	Flores <i>et al.</i> , 2013
Microemulsão	<i>Eugenia caryophyllus</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Alimentícia	He <i>et al.</i> , 2016
Microemulsão	<i>Cinnamomum cassia</i> e <i>Thymus vulgaris</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> e <i>E. coli</i>	Alimentícia	Ma, Davidson, Zhong e 2016
Emulsão e Nanoemulsão	<i>M. officinalis</i> , <i>E.caryophyllus</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>Pelargonium graveolens</i> , <i>Origanum marjorana</i> , <i>Cymbopogon martini</i> , <i>A.rosaedora</i> , <i>Salvia officinalis</i> e <i>Mentha spicata</i>	<i>E. coli</i>	Alimentícia	Salvia-Trujillo <i>et al.</i> , 2015
Nanoemulsão	<i>Helianthus annuus</i> e <i>Elaeis guineensis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>	Alimentícia	Donsi <i>et al.</i> , 2011

Tendo em vista que, na prática clínica dermatológica, as onicomicoses representam 50% de todos os distúrbios que atingem as unhas, os antifúngicos mais prescritos compreendem formulações tópicas de fácil aplicação por parte do paciente e que tendem a aumentar a adesão à terapêutica. Com isso, a busca por novos medicamentos tem sido intensificada, e, devido às suas características peculiares, os sistemas microemulsionados podem favorecer a cura e redução dos sintomas da onicomicose de uma maneira mais rápida e com menos propensão ao surgimento de reações adversas do que as terapias convencionais atualmente disponíveis no mercado (DEL ROSSO, 2014).

Diante do exposto, nota-se o quão viável pode ser esse tipo de veículo no tratamento tópico das infecções fúngicas, ainda mais quando se pensa nos antifúngicos disponíveis no mercado, os quais não satisfazem por completo a demanda clínica.

No Capítulo 1 foi avaliada a atividade antifúngica dos óleos de *A. rosaeodora*, *A. parviflora*, *A. canelilla*, *O. cymbarum*, *C. camphora*, *P. nigrum*, *M. officinalis* e *C. citratus* frente a cepas de *T. rubrum* e *C. albicans*, principais responsáveis pelas onicomicoses. No Capítulo 2 foram desenvolvidos e selecionados sistemas microemulsionados para a veiculação desses óleos e, neste Capítulo, será avaliada a atividade antifúngica dessas MEs a fim de verificar a influência do veículo no aumento da atividade antifúngica.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Nesta etapa, as MEs contendo óleos essenciais e suas respectivas formulações bases, selecionadas anteriormente no Capítulo 2, foram testadas através do ensaio de microdiluição em caldo frente às cepas de *C. albicans* e *T. rubrum*, conforme procedimento descrito no item 1.2.2 do Capítulo 1. Para a diluição das MEs, foram realizados cálculos considerando a concentração da fase oleosa (óleos essenciais ou ácido oleico) nas formulações para determinar a quantidade necessária de formulação que deveria ser tomada para se ter um valor equivalente a 3,2 mg do óleo. Logo, a massa de cada ME pesada para o teste foi de 64 mg, conforme demonstrado no cálculo abaixo:

5% de óleo essencial ou ácido oleico (5 mg) ----- 100 mg de formulação (ME)

3,2mg ----- x

$$x = \frac{100 \cdot 3,2}{5}$$

x = 64 mg de ME
-----------------

As MEs que apresentaram maior potencial de inibição fúngica, ou seja, que obtiverem CIM com 100% de atividade inibitória contra os fungos, foram escolhidas para posterior caracterização físico-química.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados dos testes de microdiluição em caldo das formulações contra as cepas de *C. albicans* e *T. rubrum* estão demonstrados na Tabela 3.2.

Com relação às formulações bases (0), é possível perceber que E<sub>0</sub>, G<sub>0</sub> e I<sub>0</sub> foram as formulações bases mais ativas contra a cepa de *T. rubrum*, ambas com CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Contudo, as formulações B<sub>0</sub> e H<sub>0</sub> também demonstraram expressiva atividade antifúngica, com CIM igual à 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Logo, de um modo geral, é possível inferir que o *T. rubrum* foi sensível à todas as MEs bases, diferentemente da *C. albicans*, que não foi tão sensível à tais formulações. De alguma maneira o dermatófito é mais susceptível aos tensoativos testados, e isso pode ter relação com as características intrínsecas deste patógeno.

Ao comparar pontualmente as formulações bases com as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus* testadas contra o *T. rubrum*, pode-se verificar que:

- A substituição do ácido oleico das B<sub>0</sub> pelos respectivos óleos essenciais ampliou a atividade antifúngica do sistema. B<sub>0</sub> foi composta por álcool isopropílico (20%), Kolliphor<sup>®</sup> EL (20%), ácido oleico (5%) e água (55%), apresentando CIM de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. As formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (B<sub>m</sub>) e *C. citratus* (B<sub>c</sub>) foram as mais ativas, ambas com CIM de 50 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Na formulação E<sub>0</sub> a substituição do ácido oleico pelos óleos essenciais não interferiu na atividade antifúngica do sistema. E<sub>0</sub> foi composta por álcool isopropílico (16,5%), Tween<sup>®</sup> 80 (16,5%), ácido oleico (5%) e água (62%), apresentando CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (E<sub>m</sub>) e *C. citratus* (E<sub>c</sub>) tiveram a mesma atividade antifúngica (CIM 100 µg.mL<sup>-1</sup>).
- Na formulação G<sub>0</sub>, a substituição do ácido oleico pelo óleo de *M. officinalis* foi capaz de aumentar a atividade antifúngica do sistema. A formulação G<sub>0</sub> foi composta por álcool etílico (20%), Tween<sup>®</sup> 20 (20%), ácido oleico (5%) e água (55%) e apresentou CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, as MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (G<sub>m</sub>) e *C. citratus* (G<sub>c</sub>) tiveram CIMs de 50 µg.mL<sup>-1</sup> e 100 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 3.2.** Atividade antifúngica (CIM) e composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus*.

Amostras (MEs)	Atividade Antifúngica das MEs		Composição das formulações microemulsionadas				
	<i>T. rubrum</i> ATCC 36232 CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<i>C. albicans</i> ATCC 28189 CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Fase Oleosa		Cotenssoativo	Tensoativo	Fase Aquosa
<b>B<sub>0</sub></b>	200	800	ácido oleico 5%		álc. Isopropílico 20%	Kolliphor®EL 20%	Água 55%
<b>B<sub>m</sub></b>	50	200	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>B<sub>c</sub></b>	50	200	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>B<sub>m+c</sub></b>	100	400	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>E<sub>0</sub></b>	100	>800*	ácido oleico 5%		álc. Isopropílico 16,5%	Tween®80 16,5%	Água 62%
<b>E<sub>m</sub></b>	100	50	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>E<sub>c</sub></b>	100	100	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>E<sub>m+c</sub></b>	100	200	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>G<sub>0</sub></b>	100	>800*	ácido oleico 5%		álc. Etfílico 20%	Tween®20 20%	Água 55%
<b>G<sub>m</sub></b>	50	50	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>G<sub>c</sub></b>	100	50	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>G<sub>m+c</sub></b>	100	50	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			

**Tabela 3.2.** (Cont.) Atividade antifúngica (CIM) e composição das formulações bases e das formulações contendo óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus*.

Amostras (MEs)	Atividade Antifúngica das MEs		Composição das formulações microemulsionadas				
	<i>T. rubrum</i> ATCC 36232 CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<i>C. albicans</i> ATCC 28189 CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Fase Oleosa		Cotensoativo	Tensoativo	Fase Aquosa
<b>H<sub>0</sub></b>	200	100	5% ácido oleico		álc. Isopropílico 17,5%	Tween®20 17,5%	Água 60%
<b>H<sub>m</sub></b>	100	100	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>H<sub>c</sub></b>	100	100	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>H<sub>m+c</sub></b>	100	200	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>I<sub>0</sub></b>	100	400	ácido oleico 5%		Transcutol®P 25%	Tween®20 25%	Água 45%
<b>I<sub>m</sub></b>	100	200	óleo <i>M. officinalis</i> 5%				
<b>I<sub>c</sub></b>	100	200	óleo <i>C. citratus</i> 5%				
<b>I<sub>m+c</sub></b>	100	400	óleo <i>M. officinalis</i> 2,5%	óleo <i>C. citratus</i> 2,5%			
<b>Fluconazol</b>	3,125	12,5	-----		-----	-----	-----

\* Não houve atividade nas condições do ensaio avaliado.

**Obs.:** As formulações destacadas em grifo amarelo foram selecionadas para a caracterização e teste de citotoxicidade que serão discutidos no próximo Capítulo.



- Substituir o ácido oleico das H<sub>0</sub> pelos respectivos óleos essenciais ampliou a atividade antifúngica do sistema. H<sub>0</sub> foi composta por álcool isopropílico (17,5%), Tween<sup>®</sup> 20 (17,5%), ácido oleico (5%) e água (60%), e demonstrou CIM de 200 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto as MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (H<sub>m</sub>) e *C. citratus* (H<sub>c</sub>) tiveram a mesma CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Substituir o ácido oleico das I<sub>0</sub> pelos respectivos óleos essenciais não interferiu na atividade antifúngica do sistema. I<sub>0</sub> foi composta por Transcutol<sup>®</sup> P (25%), Tween<sup>®</sup> 20 (25%), ácido oleico (5%) e água (45%) e teve CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>; não obstante, as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (I<sub>m</sub>) e *C. citratus* (I<sub>c</sub>) também apresentaram CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

Em relação às MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* ou *C. citratus* como fase oleosa, aquelas que se revelaram mais ativas contra o *T. rubrum* foram as B<sub>m</sub>, B<sub>c</sub> e G<sub>m</sub>, todas inibindo o fungo numa concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Estas formulações tiveram as seguintes composições: **B<sub>m</sub>**: (20%) álcool isopropílico, (20%) Kolliphor EL<sup>®</sup>, (5%) óleo essencial de *M. officinalis* e (55%) água; **B<sub>c</sub>**: (20%) álcool isopropílico, (20%) Kolliphor EL<sup>®</sup>, (5%) óleo essencial de *C. citratus* e (55%) água; **G<sub>m</sub>**: (20%) álcool etílico, (20%) Tween 20<sup>®</sup>, (5%) óleo essencial de *M. officinalis* e (55%) água.

Verifica-se que B<sub>m</sub> e B<sub>c</sub> possuem exatamente a mesma composição, alterando apenas a fase oleosa. Já G<sub>m</sub> possui cotensoativo e tensoativo diferentes das outras MEs, porém as três formulações constituem o mesmo percentual de cotensoativo, tensoativo, óleo e água e, além disso, possuem um tensoativo não-iônico combinado a um álcool de cadeia curta (álcool isopropílico ou álcool etílico) como cotensoativo, o que aprimora o sistema microemulsionado, pois, segundo Gradzielski (1998), os álcoois de cadeia curta são capazes de diminuir significativamente os módulos de flexão da interface do sistema microemulsionado e isto, muito provavelmente, amplia a capacidade antimicrobiana da ME.

Em relação à atividade das formulações bases contra *C. albicans*, é possível perceber que as MEs B<sub>0</sub>, H<sub>0</sub> e I<sub>0</sub> foram as únicas com ação efetiva, sendo que a formulação H<sub>0</sub> foi a que apresentou menor CIM (100 µg.mL<sup>-1</sup>) entre elas, enquanto que E<sub>0</sub> e G<sub>0</sub> foram inativas contra esta cepa (CIM > 800 µg.mL<sup>-1</sup>). O álcool isopropílico esteve presente tanto na formulação H<sub>0</sub> quanto na B<sub>0</sub>, e o Tween<sup>®</sup> 20 compôs as formulações H<sub>0</sub> e I<sub>0</sub>. Tendo em vista que a ME H<sub>0</sub> foi a mais ativa dentre todas e continha em sua formulação Tween<sup>®</sup> 20 e álcool isopropílico

combinados, pode-se inferir que a atividade mais acentuada dessa ME se deve à combinação destes compostos como tensoativo e cotensoativo. Isso explicaria porque as outras MEs não apresentaram atividade tão significativa.

Shahzadi e colaboradores (2014) prepararam uma ME contendo ácido oleico como fase oleosa, Tween<sup>®</sup> 20 como tensoativo, propilenoglicol como cotensoativo e água, e testaram a sua atividade antifúngica contra *C. albicans* pelo método de difusão em ágar. Os autores relataram que a formulação foi inativa contra a cepa, pois não apresentou zona inibitória, o que indica que os componentes da formulação não possuem ação fungicida. Chauhan, Muzaffar e Lohia (2013) utilizaram o mesmo método para verificar a atividade antifúngica contra *C. albicans* de uma formulação contendo óleo de canela como fase oleosa, água, e mistura de Span<sup>®</sup> 80 e do álcool isopropílico como surfactante e cosurfactante, respectivamente. Da mesma maneira, tal ME não chegou a apresentar qualquer atividade inibitória.

Essas pesquisas demonstraram que talvez a atividade encontrada no presente estudo não esteja relacionada unicamente à atividade isolada de um tensoativo ou cotensoativo, mas sim à junção dos dois agentes de superfície. Por exemplo, o Tween<sup>®</sup> 20 esteve presente na composição das duas formulações que foram mais ativas contra *C. albicans*: H<sub>0</sub> e I<sub>0</sub>. A formulação H<sub>0</sub> apresentou a seguinte composição: Tween<sup>®</sup> 20 (17,5%), álcool isopropílico (17,5%), ácido oleico (5%) e água (60%). Já a formulação I<sub>0</sub> foi composta por Tween<sup>®</sup> 20 (25%), Transcutol<sup>®</sup> P (25%), ácido oleico (5%) e água (45%). Isso torna evidente que a combinação de Tween<sup>®</sup> 20 com álcool isopropílico, mesmo em menores proporções, pode ser a causa da atividade antifúngica pronunciada contra *C. albicans* no presente estudo.

Ao comparar pontualmente as formulações bases com as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus* testadas contra a levedura, pode-se verificar que:

- A formulação base mostrou-se fracamente ativa contra o fungo, porém, ao substituir o ácido oleico das B<sub>0</sub> pelos óleos essenciais, a atividade antifúngica do sistema foi consideravelmente ampliada. B<sub>0</sub> foi composta por Kolliphor<sup>®</sup> EL(20%), álcool isopropílico (20%), ácido oleico (5%) e água (55%) e teve CIM de 800 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (B<sub>m</sub>) e *C. citratus* (B<sub>c</sub>) demonstraram mesma atividade antifúngica (CIM de 200 µg.mL<sup>-1</sup>). Logo, B<sub>m</sub> e B<sub>c</sub> foram 4 vezes mais ativas contra *C. albicans* do que a formulação base deste sistema.
- Na formulação E<sub>0</sub>, evidenciou-se que os óleos essenciais foram responsáveis pela ação antifúngica do sistema microemulsionado, e que o óleo de *M. officinalis* teve ainda maior

atividade contra *C. albicans* nessa ME. E<sub>0</sub> foi composta por álcool isopropílico (16,5%), Tween<sup>®</sup> 80 (16,5%), ácido oleico (5%) e água (62%) e não demonstrou atividade antifúngica na concentração máxima testada (CIM > 800 µg.mL<sup>-1</sup>). No entanto, as MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (E<sub>m</sub>) e *C. citratus* (E<sub>c</sub>) tiveram CIMs de 50 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

- A substituição do ácido oleico pelos óleos essenciais foi capaz de possibilitar a atividade antifúngica do sistema G<sub>0</sub>. A formulação G<sub>0</sub> foi composta por álcool etílico (20%), Tween<sup>®</sup> 20 (20%), ácido oleico (5%) e água (55%) e não demonstrou atividade antifúngica na concentração máxima testada (CIM > 800 µg.mL<sup>-1</sup>), mas ambas as MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (G<sub>m</sub>) e *C. citratus* (G<sub>c</sub>) demonstraram CIMs de 50 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Substituir o ácido oleico da formulação H<sub>0</sub> pelos óleos essenciais não interferiu na atividade antifúngica do sistema microemulsionado contra *C. albicans*. H<sub>0</sub> foi composta por álcool isopropílico (17,5%), Tween<sup>®</sup> 20 (17,5%), ácido oleico (5%) e água (60%), apresentando CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto as formulações contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (H<sub>m</sub>) e *C. citratus* (H<sub>c</sub>) tiveram a mesma CIM de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.
- A substituição do ácido oleico pelos óleos essenciais na formulação I<sub>0</sub> aumentou a atividade antifúngica do sistema, porém, nenhum dos óleos se mostrou mais ativo que o outro quando incorporados nessa ME. A formulação I<sub>0</sub> foi composta por Transcutol<sup>®</sup> P (25%), Tween<sup>®</sup> 20 (25%), ácido oleico (5%) e água (45%), apresentando CIM de 400 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto ambas as MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* (I<sub>m</sub>) e *C. citratus* (I<sub>c</sub>) tiveram CIM de 200 µg.mL<sup>-1</sup>.

Com relação às MEs contendo os óleos essenciais de *M. officinalis* ou *C. citratus* como fase oleosa, aquelas que se demonstraram mais ativas contra *C. albicans* foram as E<sub>m</sub>, G<sub>m</sub> e G<sub>c</sub>, todas com CIM de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Estas formulações tiveram as seguintes composições:

- **E<sub>m</sub>**: álcool isopropílico (16,5%), Tween<sup>®</sup> 80 (16,5%), óleo essencial (5%) de *M. officinalis* e água (62%);
- **G<sub>m</sub>**: álcool etílico (20%), Tween<sup>®</sup> 20 (20%), óleo essencial de *M. officinalis* (5%) e água (55%);
- **G<sub>c</sub>**: álcool etílico (20%), Tween<sup>®</sup> 20 (20%), óleo essencial de *C. citratus* (5%) e água (55%).

Verifica-se que  $G_m$  e  $G_c$  possuem a mesma composição, alterando apenas a fase oleosa. A  $E_m$ , por sua vez, possui cotensoativo e tensoativo diferentes em relação às outras MEs, mas todas tem em comum o fato de possuírem um tensoativo não-iônico combinado a um álcool de cadeia curta (álcool isopropílico ou álcool etílico) como cotensoativo. Esta combinação melhora a composição do sistema, pois segundo Garti e colaboradores (2001), o álcool é capaz de mudar a polaridade das fases polar e apolar e aumentar a flexibilidade da interface, o que pode ampliar as propriedades da ME, inclusive de melhora da permeabilidade.

Frente ao exposto, as observações demonstraram que as MEs bases, sem os óleos essenciais na constituição, tiveram uma boa atividade, até bem mais expressiva do que as atividades dos óleos essenciais isolados, obtidas no Capítulo 1, tendo em vista que a CIM do óleo essencial de *M. officinalis* correspondeu a  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contra ambos os fungos e a CIM de *C. citratus* foi de 800 e  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a levedura e para o dermatófito, respectivamente. Isso só reforça o fato de que as MEs atuam como agentes antimicrobianos autoconservantes *per se* (FRIBERG; LIANG, 1984).

O autor Zhang e seus colaboradores (2010) obtiveram um sistema microemulsionado contendo monolaurato de glicerol como fase oleosa, etanol como cosurfactante, Tween® 40 como surfactante, diacetato de sódio e água e ainda verificaram suas atividades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans*, *Aspergillus niger* e *Penicillium expansum*, através do ensaio de difusão em meio sólido. A cinética de morte demonstrou que a ME causou uma perda completa da viabilidade de células bacterianas em 1 minuto, destruindo mais de 99% de esporos de *A. niger* e *P. expansum* e 99,9% de células de *C. albicans* dentro de 2 min, mas ocasionou perda completa da viabilidade dos fungos em 5 min. O estudo confirmou que a membrana citoplasmática celular é o alvo de ação da ME, pois, ao interagir com as membranas microbianas, gera ruptura na estrutura e disfunção das membranas.

De todas as MEs testadas, a que foi considerada melhor no critério de atividade antifúngica foi a formulação  $G_m$ , pois apresentou CIM de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , tanto contra *C. albicans* como para *T. rubrum*, e teve sua formulação composta por: Tween® 20 (20%), álcool etílico (20%), óleo essencial de *M. officinalis* (5%) e água (60%). Percebe-se que o Tween® 20, mesmo em menores concentrações, destacou-se em relação aos outros tensoativos e o álcool etílico também se mostrou efetivo como cotensoativo, o que reforça a ideia que já foi dita

anteriormente de que um tensoativo, no caso não-iônico, combinado a um álcool de cadeia curta, formam sistemas microemulsionados mais promissores.

El-sayed e colaboradores (2017) utilizaram o método de difusão em ágar para verificar a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Allium sativum* (alho) de casca roxa, quando diluídos em álcool isopropílico absoluto, nas concentrações de: 0,2% (m: 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 0,4% (m: 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 0,6% (m: 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 0,8% (m: 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 1,0% (m: 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (m/v). As misturas do óleo essencial e do álcool demonstraram atividade antimicrobiana dose-dependente contra as bactérias patogênicas e fungos testados na pesquisa, dentre eles os fungos *A. niger* e *A. flavus*. Para o *A. niger*, as zonas inibitórias produzidas a partir das concentrações das diluições utilizadas foram de: 3,33 nm (0,2%), 5,17 nm (0,4%), 7,17 nm (0,6%), 10,17 nm (0,8%) e 12,83 nm (1,0%); por outro lado, as zonas de inibição frente à cepa de *A. flavus* foram de: 6,17 nm (0,2%), 8,83 nm (0,4%), 11,83 nm (0,6%), 15,5 nm (0,8%) e 20,17 nm (1,0%). Esse estudo demonstrou a alta atividade antimicrobiana do álcool isopropílico como veículo, logo, pode-se presumir que sua atividade juntamente com o tensoativo e o óleo essencial de *M. officinalis* foi o que propiciou um aumento da atividade antifúngica das MEs estudadas.

De um modo geral, a mistura de óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus* em todas as MEs testadas ( $B_{m+c}$ ,  $E_{m+c}$ ,  $G_{m+c}$ ,  $H_{m+c}$  e  $I_{m+c}$ ) não apresentaram maior ação antifúngica em relação às formulações contendo apenas um dos óleos essenciais, ou seja, nenhuma das misturas mostrou-se mais vantajosa que o uso do óleo sem associação (individualmente).

Não foram encontradas na literatura MEs utilizando os óleos essenciais de *M. officinalis* e de *C. citratus* como fase oleosa, assim como também não foram encontrados estudos referentes à mistura destes óleos em sistemas microemulsionados, bem como à mistura dos óleos isolados. Contudo, pode-se pressupor que a redução da concentração de ambos os óleos essenciais pela metade (2,5% de *M. officinalis* e 2,5% de *C. citratus*) na composição da fase oleosa das MEs, tenha contribuído para que não houvesse um aumento da atividade antifúngica, tendo em vista que as MEs contendo apenas um dos óleos essenciais (5% de óleo na formulação) se mostraram mais efetivas.

O aumento da atividade antifúngica das MEs contendo óleos essenciais de *M. officinalis* ou *C. citratus* pode ser explicado pelo aumento da “solubilidade” dos óleos essenciais na fase aquosa, devido à redução da tensão interfacial ocasionada pelos surfactantes em associação com o cossurfactante, que auxiliam as gotículas dos óleos essenciais a

permanecerem englobadas nas pequenas gotículas de ME (<100 nm), podendo aumentar potencialmente os mecanismos de absorção celular passiva do óleo essencial microemulsionado, reduzindo as resistências de transferência de massa e aumentando a permeação no microrganismo. Assim sendo, as micelas de surfactante em MEs também podem levar ao aumento da permeabilidade na parede celular fúngica e tornar os óleos essenciais mais eficazes, pois, ao passo que as micelas são adsorvidas à superfície da célula, a concentração do óleo essencial aumentará nesse ponto (GAYSINSKY *et al.*, 2005; GAYSINSKY *et al.*, 2008; BASAK; GUHA, 2017).

A partir dessas análises, a seleção das MEs que seriam posteriormente caracterizadas através de métodos físico-químicos foi pautada em escolher uma formulação de cada um dos cinco pontos que apresentasse as menores atividades frente às cepas de *C. albicans* e *T. rubrum*, simultaneamente. Dessa maneira, as MEs que atenderam a estes requisitos foram aquelas que continham óleo essencial de *M. officinalis* como fase oleosa. As formulações destacadas em grifo amarelo na Tabela 3.2 compreendem os pontos selecionados para a próxima etapa de testes (Capítulo 4).

### 3.4 REFERÊNCIAS

BAROT, B. S.; PAREJIYA, P. B.; PATEL, H. K.; MEHTA, D. M.; SHELAT, P. K. Microemulsion-based antifungal gel delivery to nail for treatment of onychomycosis: formulation, optimization, and efficacy studies. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 2, n. 6, p. 463-476, 2012.

BASAK, S.; GUHA, P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 75, p. 616-623, 2017.

BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

CHAUHAN, L.; MUZAFFAR, F.; LOHIA, S. Design, development and evaluation of topical microemulsion. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 605-610, 2013.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical Research**, v.12, p. 1561-1572, 1995.

CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 3, p. 385-391, 2003.

DEL ROSSO, J. Q. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 7, n. 7, p. 10-18, 2014.

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, n. 9, p. 1908-1914, 2011.

EL-SAYED, H. S.; CHIZZOLA, R.; RAMADAN, A. A.; EDRIS, A. E. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 221, p. 196-204, 2017.

FLORES, F. C.; DE LIMA, J. A.; RIBEIRO, R. F.; ALVES, S. H.; ROLIM, C. M.; BECK, R. C.; DA SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281-286, 2013.

FRIBERG, S. E.; LIANG, P. W/O microemulsions of styrene monomer and dimer. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 22, n. 7, p. 1699-1705, 1984.

GARTI, N.; YAGHMUR, A.; LESER, M. E.; CLEMENT, V.; WATZKE, H. J. Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2552-2562, 2001.

GRADZIELSKI, M. Effect of the cosurfactant structure on the bending elasticity in nonionic oil-in-water microemulsions. **Langmuir**, v.14, n. 21, p. 6037–6044, 1998.

GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, M.; BRUCE, D.; WEISS, J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2559-2566, 2005.

GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Formulation and characterization of phytophenol-carrying antimicrobial microemulsions. **Food Biophysics**, v. 3, n. 1, p. 54-65, 2008.

GUIMARÃES, G. P.; REIS, M. Y. F. A.; DA SILVA, D. T. C.; MENDONÇA JR, F. J. B.; CONVERTI, A.; PESSOA, JR, A.; DE LIMA, DAMASCENO, B. P. G. L.; DA SILVA, J. A. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 545-550, 2014.

HE, S.; REN, X.; LU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; SUN, L. Microemulsification of clove essential oil improves its *in vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum*. **Food Control**, v. 65, p. 106-111, 2016.

JADHAV, K. R.; SHAIKH, I.M.; AMBADE, K.W.; KADAM, V. J. Applications of Microemulsion Based Drug Delivery System. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 267-273, 2006.

JADHAV, K. R.; SHETYE, S. L; KADAM, V. J. Design and Evaluation of Micro emulsion Based Drug Delivery System. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v.1, n.3, p.580-591, 2010.

LIMA, M. P. D.; LOPES, E. M.; GOMES, L. D. S.; FRANÇA, A. R. S.; ACHA, B. T.; CARVALHO, A. L. M.; ALMEIDA, F. R. C. Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.28, n. 9, p. 691-702, 2018.

MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**, v. 226, p. 20-25, 2016.

MISHRA, A.; PANOLA, R.; RANA, A. C. Microemulsions: as drug delivery system. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 467-474, 2014.

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



SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547-556, 2015.

SHAHZADI, I.; MASOOD, M. I.; CHOWDHARY, F.; ANJUM, A. A.; NAWAZ, M. A.; MAQSOOD, I.; ZAMAN, M. Q. Microemulsion formulation for topical delivery of miconazole nitrate. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 24, n. 6, p. 30-36, 2014.

VANDAMME, T. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n.1, p. 15-34, 2002.

XAVIER-JUNIOR, F. H.; VAUTHIER, C.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; EGITO, E. S. T. Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.43. n.5, p. 700-714, 2017.

ZHANG, H.; CUI, Y.; ZHU, S.; FENG, F.; ZHENG, X. Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 154–160, 2010.

# **CAPÍTULO 4**

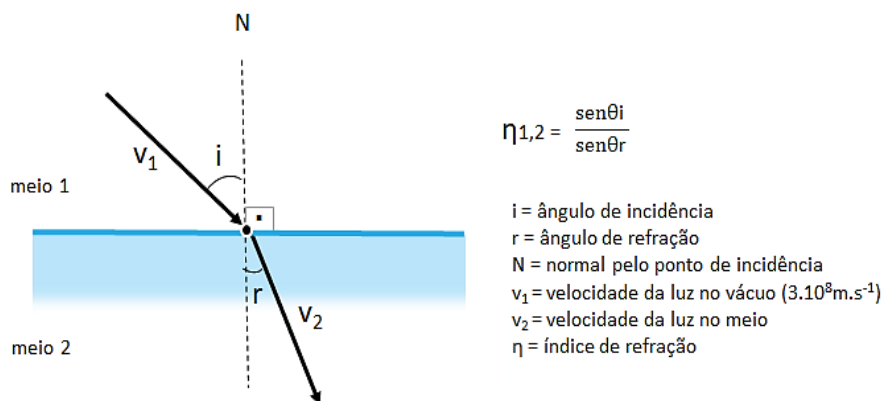
## CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES E TESTE DE CITOTOXICIDADE

### 4.1 REVISÃO DE LITERATURA

As MEs são conceituadas como misturas transparentes, estáveis e isotrópicas de óleo, água e surfactante, frequentemente em combinação com um coagente tensoativo (LAWRENCE; REES, 2012) e, devido à possibilidade de diferentes tipos de estruturas, a caracterização das MEs é uma tarefa muito difícil. Por esta razão, muitas técnicas foram desenvolvidas para este propósito e a combinação de mais de uma delas é necessária para se ter uma caracterização confiável (AZEEM *et al.*, 2009). Dentre as técnicas mais empregadas na caracterização desses sistemas, estão a determinação de: índice de refração ( $\eta$ ), transmitância ( $T_r$ ), espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering), índice de polidispersão (PDI - polydispersity index), potencial Zeta ( $\xi$ ) e condutividade elétrica.

A transparência dos sistemas microemulsionados pode ser comprovada através da determinação do índice de refração e da transmitância da amostra por espectrofotometria de UV-vis.

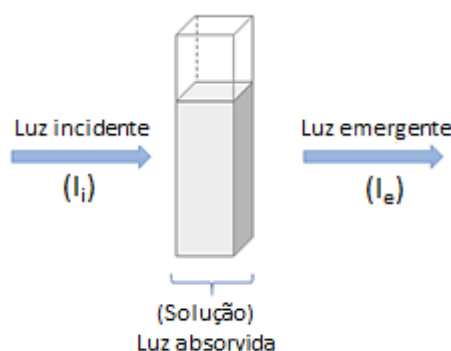
O fenômeno da refração da luz (Figura 4.1) ocorre quando um feixe de luz sofre um desvio de trajetória e variação na velocidade ao incidir sobre outro meio transparente, que não o ar. Sendo assim, o índice de refração é definido como a razão entre a velocidade de radiação de uma frequência particular no vácuo e a velocidade de radiação da mesma frequência no meio incidido (SINKO, 2008.). Qualquer meio que apresente índice de refração próximo ao da água, significa dizer que o meio em questão possui a mesma transparência e fluidez que a água.



**Figura 4.1.** Demonstração do fenômeno da refração da luz através da água.

**Fonte:** Adaptado de BrasEq, 2018; Gil, 2010.

A espectrofotometria de UV-vis também pode ajudar na avaliação da transparência de sistemas líquidos. A relação existente entre a luz incidente ( $I_i$ ) e a luz emergente ou transmitida ( $I_e$ ) é denominada transmitância e o valor máximo que pode imergir é de 100%, quando a amostra não oferece nenhuma barreira à passagem da luz. Se determinada solução não absorve energia,  $I_e$  e  $I_i$  tem o mesmo valor e, conseqüentemente,  $T_r = 1 = 100\%$ , o que significa dizer que o meio é completamente transparente. A Figura 4.2 ilustra a técnica (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).



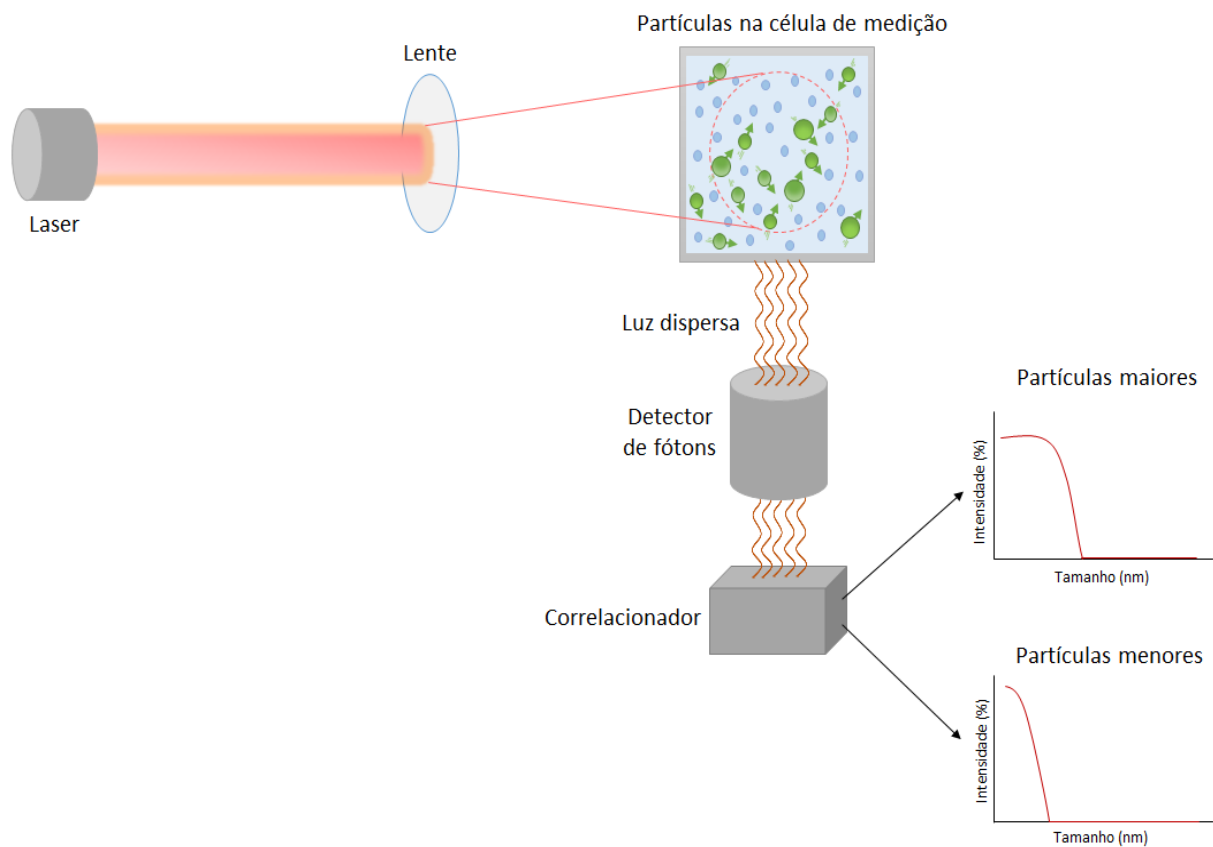
**Figura 4.2.** Transmissão e absorção da luz através de uma solução. **Fonte:** Adaptado de Cienfuegos e Vaitsman, 2000.

Sabe-se que a distribuição do tamanho de gotículas é um dos parâmetros mais importantes para caracterizar uma ME, tanto em termos de estabilidade quanto de considerações biofarmacêuticas (LU; GAO, 2010). O ensaio é realizado pelo método de DLS (Figura 4.3), que se trata de uma técnica rápida, robusta, não invasiva e estabelecida para medir o tamanho (diâmetro) de partículas sólidas ou gotículas líquidas – cuja escala varia de alguns nanômetros a cerca de um micron – como também a distribuição de seus tamanhos em uma dada “suspensão”. Um experimento típico de dispersão de luz baseia-se na exposição da amostra à uma onda de luz monocromática e um detector apropriado que é responsável por detectar o sinal de dispersão da luz através da difusão de partículas.

Dessa forma, quando o feixe de luz laser encontra a solução, a luz incidente se espalha em todas as direções em função do tamanho e da forma de suas partículas ou gotículas (no caso das MEs) e a intensidade de dispersão da luz é então registrada pelo detector em um determinado ângulo. Na dispersão de luz estática, a intensidade da luz difundida é analisada como intensidade temporal, que fornece informações úteis sobre o peso molecular e o raio de rotação das partículas. Por outro lado, ao medir as flutuações da intensidade da luz difusa ao longo do tempo, as quais resultam do movimento browniano das partículas, é possível obter o

coeficiente de difusão translacional ( $D\tau$ ), que está relacionado ao tamanho hidrodinâmico das partículas (HALLETT, 1994; DUBIN; ZIETZ; GABRIEL, 2002; ASCHINGER; WINTER, 2012; STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016; CADOGAN *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2018).

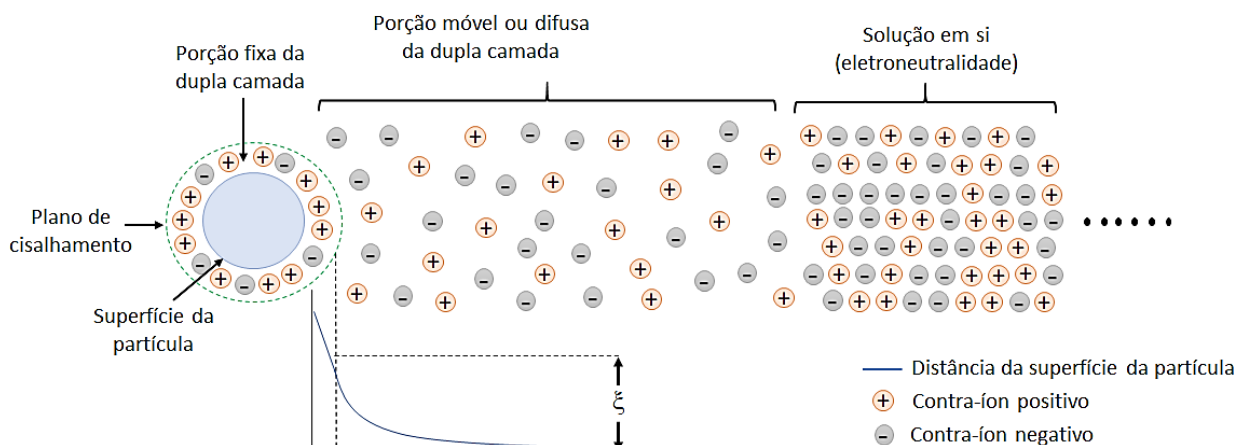
Com relação à concentração da amostra durante a medição, a técnica DLS pleiteia que a mesma esteja opticamente clara, para que apenas um espalhamento de luz aconteça, pois, a ocorrência de múltiplas dispersões ocasiona deslocamentos múltiplos de fase para a luz difusa que geram, como resultados, tamanhos de partículas muito pequenos. Assim sendo, muitas vezes é necessário que as amostras sejam diluídas para espalharem a luz dentro dos limites de detecção e, conseqüentemente, fornecer dados mais consistentes (HALLET, 1994; CADOGAN *et al.*, 2017).



**Figura 4.3.** Ilustração esquematizando a obtenção do tamanho de gotículas e índice de polidispersão através do método de DLS. **Fonte:** Adaptado de Wikipedia, 2010; Particular Science, 2018; PTL, 2018.

O índice de polidispersão consiste basicamente numa representação da distribuição do tamanho de populações dentro de uma dada amostra, fornecendo informações sobre sua homogeneidade. O valor numérico do PDI varia de 0,0 (que representa uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de suas partículas) a 1,0 (amostra altamente polidispersa com inúmeras populações de tamanho de partículas). Logo, altos valores de PDI indicam heterogeneidade do diâmetro das gotículas, ao passo que índices menores que 0,2 sugerem que o diâmetro das gotículas se encontra distribuído em uma estreita faixa de variação. (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; DANAEI *et al.*, 2018). Normalmente, as gotículas de ME são bastante monodispersas e a polidispersividade costuma ser de cerca de 0,1 (KUMAR; MITTAL, 1999).

Outro parâmetro importante para verificar a estabilidade da ME é o potencial Zeta, que consiste em avaliar o potencial eletrostático existente no plano de cisalhamento de uma gotícula, estando relacionado à carga de superfície e ao ambiente local desta, ou seja, é a diferença de potencial entre a superfície da camada fortemente ligada (plano de cisalhamento) e a região eletricamente neutra da solução. O potencial diminui gradualmente à medida que aumenta a distância da superfície. Isso ocorre porque os contra-íons próximos à superfície atuam como uma proteção que reduz a atração eletrostática entre a superfície carregada e aqueles contra-íons que estão mais afastados da superfície. Dessa forma, o potencial Zeta governa o grau de repulsão entre as partículas dispersas adjacentes de cargas semelhantes (Figura 4.4) (SINKO, 2008; ZHANG *et al.*, 2008).



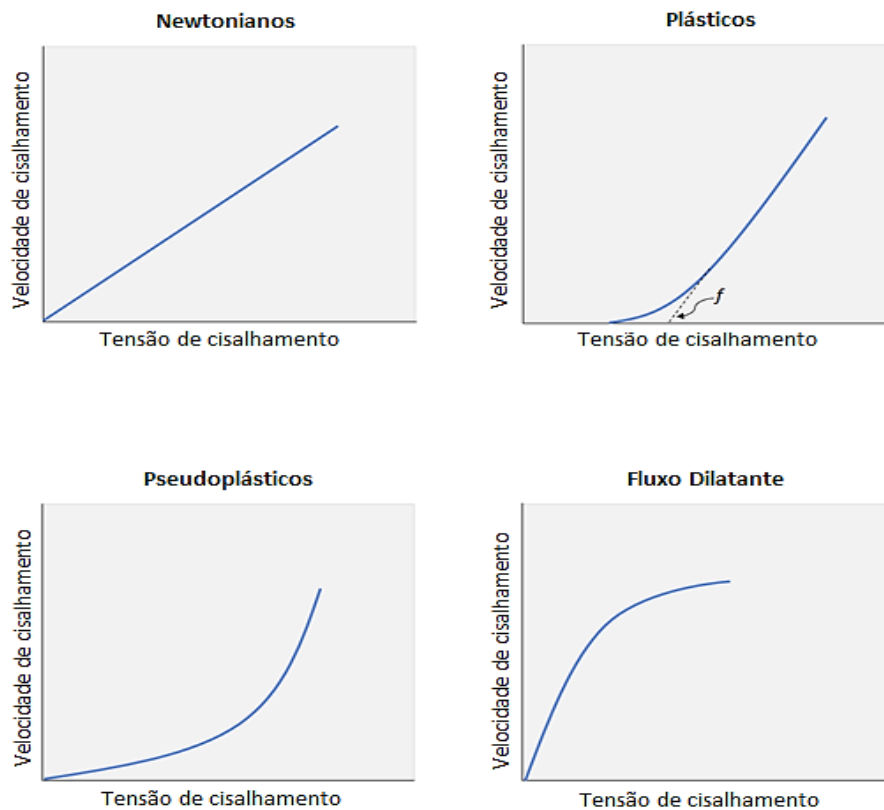
**Figura 4.4.** Ilustração demonstrando a carga de superfície existente ao redor das gotículas que pode ser determinada pelo potencial Zeta. **Fonte:** Sinko, 2008, com modificações.

Para as emulsões, que sofrem com fenômenos de instabilidade e tendem à separação de fases, quanto maior o módulo do valor do potencial Zeta, maior a repulsão entre as gotículas, o que desacelera a coalescência entre os glóbulos (AULTON, 2005). Ao contrário das macroemulsões, o potencial Zeta não é determinante para inferir sobre a qualidade das MEs, uma vez que são sistemas termodinamicamente estáveis. O valor do potencial Zeta, neste caso, está mais relacionado com a natureza da porção polar do tensoativo. Altos valores do potencial Zeta são decorrentes do emprego de tensoativos iônicos, ao passo que tensoativos não iônicos geram MEs com baixos valores de potencial Zeta (FAZULLIN; MAVRIN; SHAIKHIEV, 2015).

De um modo geral, os tipos de microestruturas presentes nas MEs podem ser investigadas pela determinação da condutividade elétrica da fase externa ou contínua. A condutividade elétrica é uma ferramenta sensível e frequentemente utilizada na investigação de mudanças estruturais em emulsões e na determinação da natureza da fase dispersante (ROSSI *et al.*, 2007), que pode ser aquosa ou oleosa. Emulsões A/O possuem baixos valores de condutividade elétrica, uma vez que a fase dispersante oleosa não é boa condutora de eletricidade. Já emulsões O/A apresentam altos valores de condutividade elétrica, visto que a água é um excelente condutor (ASSIS, 2018).

As preparações tópicas devem possuir características reológicas que facilitam sua espalhabilidade quando aplicada à pele durante o uso. A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material testado quando submetido a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas, ao longo de um intervalo de tempo e avalia certas propriedades, como elasticidade, viscosidade e plasticidade. Estudos reológicos geralmente envolvem relações entre taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento (WOOD, 1986; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; SCHRAMM, 2006; KUMAR; KUSHWAHA; SHARMA, 2014).

A Lei de Newton para viscosidade diz que a relação entre a tensão de cisalhamento (força de cisalhamento x área) e o gradiente local de velocidade é definida por meio de uma relação linear, sendo a constante de proporcionalidade a viscosidade do fluido, isto é, quando se tem uma relação linear, a viscosidade do fluido é constante, independentemente da taxa ou tensão aplicadas na amostra, e, como demonstrado na Figura 4.5, a linha cruza a origem. Logo, todos os materiais que apresentam esse comportamento são denominados fluidos newtonianos (LANGEVIN, 1988; SCHRAMM, 2006).



**Figura 4.5.** Reogramas representativos do comportamento de materiais correspondendo a fluidos newtonianos, e fluidos não newtonianos plásticos, pseudoplásticos e fluxo dilatante. **Fonte:** Adaptado de Sinko, 2008.

Contudo, em outros casos, essa relação pode ser não linear e, então, o fluxo é classificado como não newtoniano, podendo ser, ainda, subclassificado como plástico, pseudoplástico ou fluxo dilatante.

No caso do fluxo plástico, a curva não passa pela origem, mas intercepta o eixo de tensão de cisalhamento em um ponto específico denominado valor de cedência ( $f$ ), isso significa que o fluxo não inicia até que esse valor de tensão de cisalhamento seja excedido e que a substância se comportará como um material sólido (elástico) quando em tensões menores (Figura 4.5).

Em contrapartida, o fluxo pseudoplástico parte da origem e, como não há valor qualquer de cedência, o material flui assim que uma tensão de cisalhamento é aplicada, e a sua viscosidade diminui proporcionalmente ao aumento da velocidade de cisalhamento; não é possível considerar apenas um valor de viscosidade nesse tipo de fluxo, já que nenhuma parte da curva mostra linearidade (Figura 4.5).



O fluxo dilatante, por sua vez, opõe-se à pseudopasticidade, já que sua viscosidade se torna cada vez maior à medida que a velocidade de cisalhamento aumenta (Figura 4.5). Esses sistemas são denominados dilatantes, pois seu volume aumenta durante o cisalhamento, mas, quando a tensão de cisalhamento é suspensa, a natureza fluida do sistema é reestabelecida (SINKO, 2008; AULTON; TAYLOR, 2016).

As MEs usualmente comportam-se como fluidos newtonianos e sua viscosidade é comparada à da água, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, provavelmente devido à coalescência reversível de suas micelas (LANGEVIN, 1988; SCHRAMM, 2006). Este método é utilizado na caracterização de emulsões, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema, além de ser empregado para averiguar a qualidade durante o processo de produção, e permitir o estudo do efeito de aditivos na formulação (SCOTT, 2000).

É muito importante, também, determinar o pH da formulação, visto que o pH biológico do corpo humano varia conforme o sítio anatômico. Formulações de uso tópico precisam ter um pH próximo ao da pele, considerando que o pH tem um relevante papel tanto para a compatibilidade da ME com o manto ácido da pele, quanto para a estabilidade da formulação (RODRIGUES, 1997).

Quando se deseja avaliar se uma determinada substância é tóxica às células do organismo, a caracterização da citotoxicidade *in vitro* é uma prática comum nesse tipo de avaliação biológica de produtos para a saúde e fundamental para a análise inicial da biocompatibilidade dos mesmos. Pela exposição de uma cultura celular a determinado biomaterial de interesse, é possível caracterizar reações adversas de citotoxicidade resultantes (MASSON; LOMBELLO, 2016). Nos últimos 50 anos, o bioensaio Alamar Blue tem sido largamente utilizado em estudos que avaliam a viabilidade celular e citotoxicidade de uma variedade de sistemas biológicos e ambientais. A técnica faz uso de um indicador de óxido-redução (redox) sensível à função mitocondrial e parte do princípio de que as células viáveis do meio de cultura são capazes de reduzir o Alamar Blue ou resazurina (azul e não fluorescente) à resorufina (rosa e altamente fluorescente). Logo, a alteração da coloração indica que a substância teste não foi capaz de provocar morte celular e que as células do meio de cultura permanecem viáveis. A mudança do estado oxidado para o estado reduzido permite flexibilidade de detecção onde as medidas podem ser quantitativas, como leituras colorimétricas e/ou fluorométricas, ou qualitativas, como uma alteração visível na cor indicando presença ou ausência de células viáveis (ZHI-JUN *et al.*, 1997; SPRINGER; AZBILL; CARLSON, 1998; RAMPERSAD, 2012).

Sendo assim, para se caracterizar uma ME é necessária uma combinação de técnicas específicas que permitam compreender melhor o sistema microemulsionado avaliado e suas características físico-químicas. Ensaio biológicos, como a citotoxicidade, também contribuem para a escolha das substâncias envolvidas na composição da formulação, verificando se, de fato, as mesmas não serão tóxicas ao ser humano.

## **4.2 METODOLOGIA**

### **4.2.1 Caracterização físico-química das microemulsões**

#### **4.2.1.1 Índice de refração**

O índice e refração foi determinado com o auxílio do refratômetro de bancada QUIMIS<sup>®</sup>, devidamente calibrado com água destilada. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.1.2 Determinação do pH das microemulsões**

Para determinar o pH das formulações, utilizou-se o potenciômetro Tecno<sup>®</sup>, que foi previamente calibrado com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.1.3 Transmitância**

O percentual de transmitância das MEs foi mensurado em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 650 nm, empregando a água destilada como o branco e utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm (LV *et al.*, 2017). Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.1.4 Condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica foi efetuado por meio de condutivímetro ION<sup>®</sup> 30107-03-BI, calibrado com solução padrão de 1000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.1.5 Determinação da viscosidade e comportamento reológico**

A determinação da viscosidade e do comportamento reológico das MEs foi realizada em reômetro Brookfield Viscometer Digital DV-II + Pro (Spindle: SC4 -18) acoplado ao software Brookfield Rheocale versão 3.2. As análises reológicas foram obtidas com variação de

velocidade de 0 a 120 rpm (curva ascendente) e de 120 a 0 rpm (curva descendente), com um tempo de 10 segundos de leitura e 20 pontos. Os gráficos de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento foram elaborados no *software* Excel versão 2016. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.1.6 Determinação do tamanho de gotícula, potencial Zeta e PDI**

As medidas referentes aos tamanhos de gotícula, potencial Zeta e PDI das MEs foram determinadas por meio do equipamento Zetasizer ZS e as amostras foram previamente diluídas com água destilada na proporção de 1:10 (v/v). Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.2.2 Teste de citotoxicidade**

Este bioensaio foi realizado em parceria com o Laboratório de Atividade Biológica – BIOPHAR e o Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pela Doutoranda Márcia Cruz.

##### **4.2.2.1 Células**

Neste ensaio *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) mantidos em garrafas de cultura contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico ampicilina-estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **4.2.2.2 Ensaio de viabilidade celular: método de Alamar Blue**

O ensaio de citotoxicidade das amostras de óleo essencial de *M. officinalis* e das formulações B<sub>m</sub>, E<sub>m</sub>, G<sub>m</sub>, H<sub>m</sub> e I<sub>m</sub> foi realizado pelo método de Alamar Blue segundo Ahmed, Gogal e Walsh (1994).

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,5 \times 10^4$  células/poço com um volume final de 100  $\mu\text{L}$  por poço. Após 24 h de incubação e aderência, as células foram tratadas com os compostos previamente diluídos em DMSO (Sigma-Aldrich) em concentração única de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A realização do teste se deu em triplicata por um tempo de tratamento de 24h e o controle positivo utilizado foi o fármaco padrão de morte doxorrubicina (Sigma-Aldrich) e o controle negativo foi o meio de cultura.

Decorrido 24h de tratamento, foram acrescentados 10  $\mu\text{L}$  da solução de uso de Alamar Blue (0,02% no poço) em cada poço da placa. Após 3 h de metabolização de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa 30 minutos antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de microplaca Elisa (DTX-800 Beckman e Coulter) na faixa de 540 nm de excitação e 585 nm de emissão. Cada amostra foi analisada em triplicata.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As MEs estudadas apresentaram baixa viscosidade (Tabela 4.1), comprovando sua natureza fluida. Dentre estas, a mais viscosa foi a formulação I<sub>m</sub> (23,56 cP) e a menos viscosa foi a formulação H<sub>m</sub> (9,0 cP). A ME I<sub>m</sub> foi composta por Transcutol® P (25%), Tween® 20 (25%), óleo essencial de *M. officinalis* (5%) e água (45%), enquanto que a formulação H<sub>m</sub> foi composta por álcool isopropílico (17,5%), Tween® 20 (17,5%), óleo essencial de *M. officinalis* (5%) e água (60%).

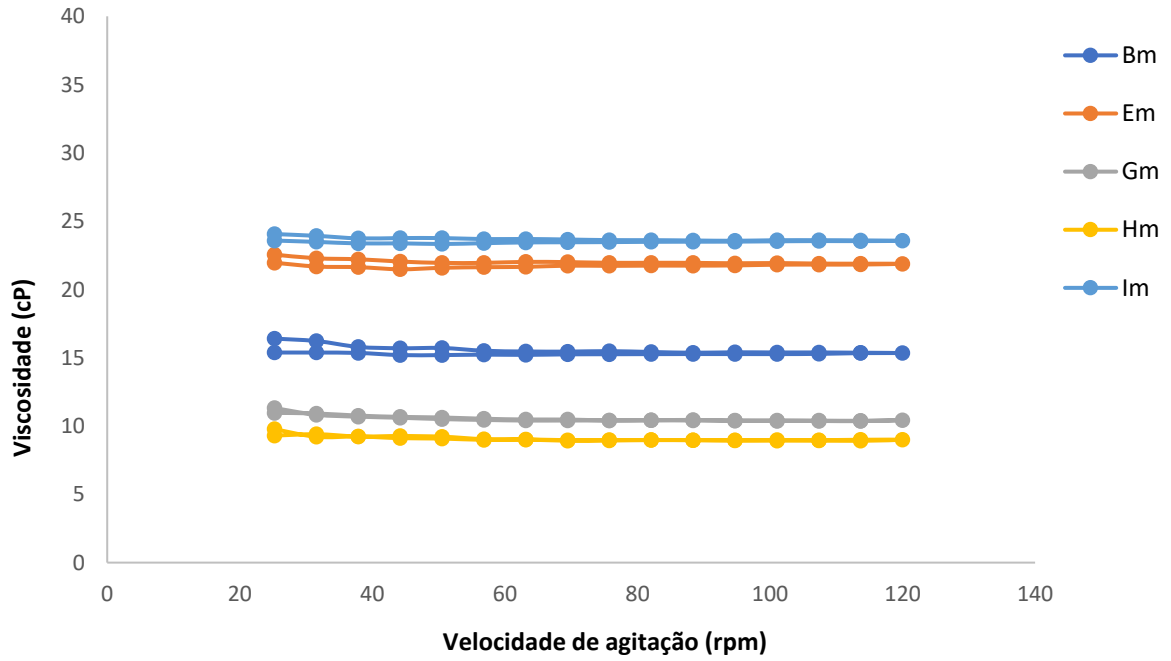
Avaliando as composições de cada uma, bem como as proporções entre si, é possível notar que ambas as MEs tiveram como tensoativo o Tween® 20, porém a H<sub>m</sub> teve como cotensoativo um álcool, que é conhecidamente volátil e bem líquido, ao contrário do Transcutol® P, o cotensoativo usado na I<sub>m</sub> e que tem natureza mais viscosa. Além disso, H<sub>m</sub> teve menos surfactantes na sua formulação (35%), com a maior parte de sua fórmula composta por água (60%), sendo, por estes fatores, menos viscosa do que a I<sub>m</sub>.

**Tabela 4.1.** Valores referentes ao ensaio de viscosidade das MEs estudadas.

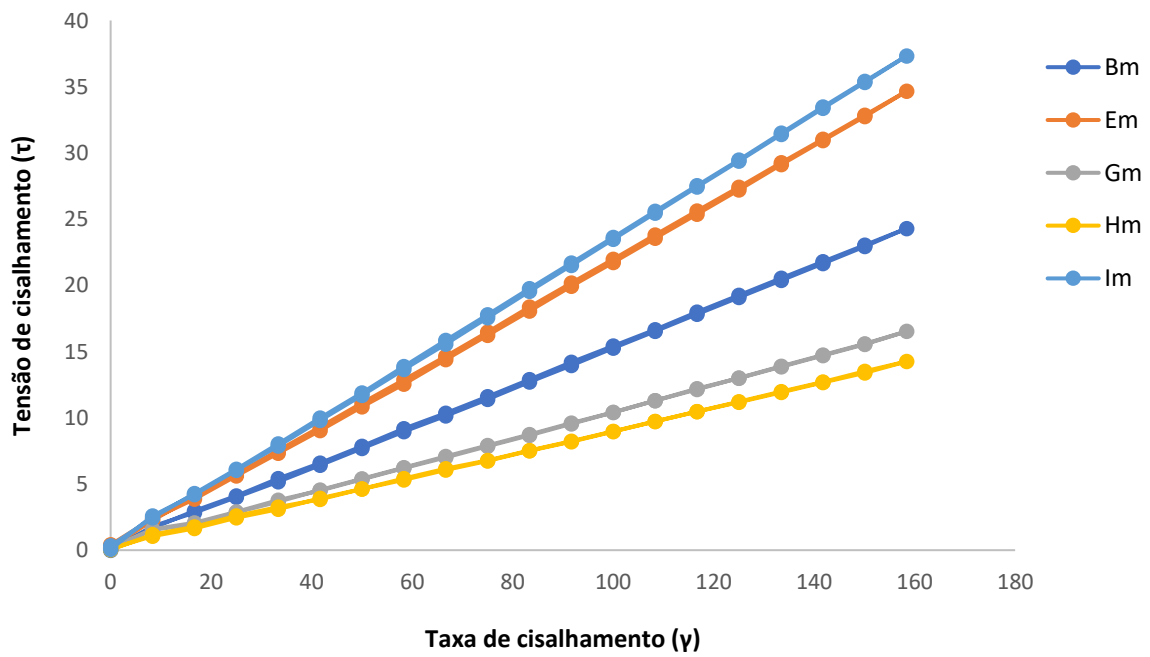
Amostras	Viscosidade (cP)
	$\bar{x} \pm DP$
B <sub>m</sub>	15,34 ± 0,28
E <sub>m</sub>	21,88 ± 0,21
G <sub>m</sub>	10,43 ± 0,22
H <sub>m</sub>	9,00 ± 0,18
I <sub>m</sub>	23,56 ± 0,16

\***DP:** Desvio Padrão

Com relação ao comportamento reológico dos sistemas, o mesmo apresentou comportamento do tipo Newtoniano, como demonstrado no Gráfico 4.1, no qual é possível constatar que não houve alteração significativa da viscosidade de acordo com a mudança da velocidade de agitação (Gráfico 4.2).



**Gráfico 4.1.** Comportamento da variação de viscosidade versus velocidade de agitação das formulações testadas.



**Gráfico 4.2.** Comportamento reológico das formulações testadas.

Outra característica importante das MEs é a transparência dos sistemas, que foi confirmada pelos valores de transmitância encontrados (Tabela 4.2), todos acima de 99%, o que significa que apenas 1% dos raios UV incididos sobre a amostra não foram capazes de atravessá-la. A transparência também foi confirmada pelo índice de refração muito próximo ao valor da água, que é de 1,333 (GIL, 2010).

**Tabela 4.2.** Valores referentes aos ensaios de índice de refração e transmitância das formulações estudadas.

Amostras	Índice de refração ( $\eta$ )	Transmitância (%)
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
B <sub>m</sub>	1,377 $\pm$ 0,0003	99,43 $\pm$ 0,31
E <sub>m</sub>	1,384 $\pm$ 0,0006	99,37 $\pm$ 0,25
G <sub>m</sub>	1,380 $\pm$ 0,0006	99,50 $\pm$ 0,36
H <sub>m</sub>	1,379 $\pm$ 0,0008	99,23 $\pm$ 0,50
I <sub>m</sub>	1,405 $\pm$ 0,0003	99,33 $\pm$ 0,29

\*DP: Desvio Padrão

O tamanho das gotículas também responde pela transparência, uma vez que gotículas com diâmetros inferiores ao comprimento de onda da luz, que varia de 380 a 780 nm (CIENFUENGOS; VAITSMAN, 2000), não oferecem barreira à passagem da luz. Todas as MEs apresentaram diâmetro médio inferior a 108 nm (Tabela 4.3), o que também explica a transparência dos sistemas. Entretanto, para a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), serão classificadas como MEs os sistemas cujo diâmetro médio de gotículas varie de 1 a 100 nm, usualmente 10 a 50 nm (KHAN *et al.*, 2006; RAKSHIT; MOULIK, 2009). Neste caso, todas as MEs cumprem esse requisito, exceto pela H<sub>m</sub>. Contudo, outros autores consideram outras faixas, que variam de 10 a 140 nm (AHAMMED *et al.*, 2013; ŽILIUS *et al.*, 2016) e 5 a 200 nm (PAUL; MITRA; MOULIK, 2007; MISHRA; PANOLA; RANA, 2014). Nesse caso, a amostra H<sub>m</sub> encontra-se adequadamente classificada como ME. Neste trabalho, levando-se em conta os demais resultados, a amostra H<sub>m</sub> foi considerada um sistema microemulsionado.

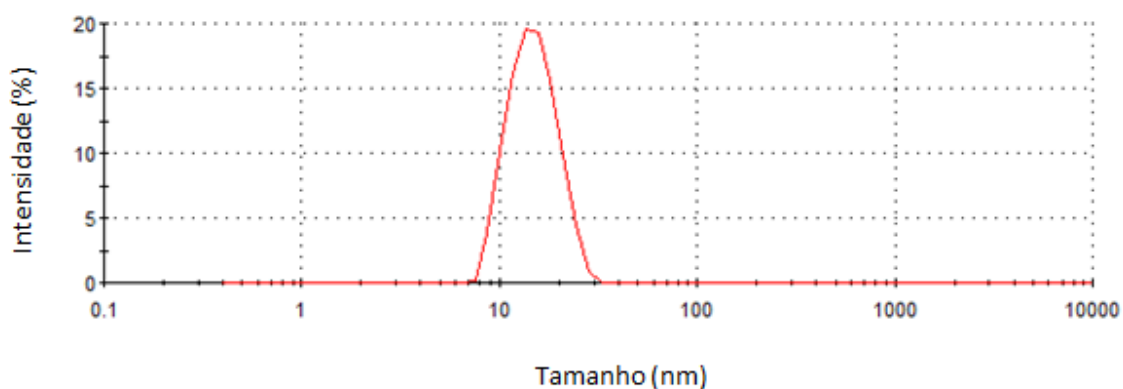


**Tabela 4.3.** Valores referentes aos ensaios de tamanho de gotícula, PDI e potencial Zeta das ME estudadas.

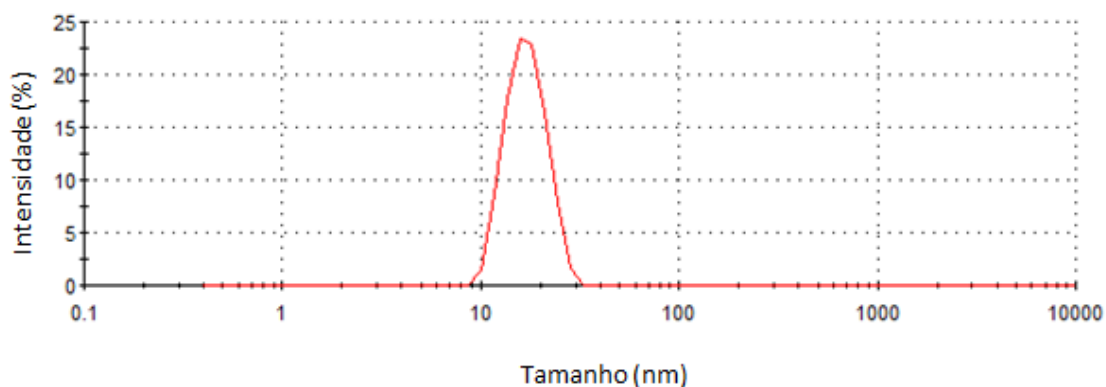
Amostras	Tamanho de gotícula (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
B <sub>m</sub>	12,6 ± 3,11	0,124 ± 0,042	-1,92 ± 2,37
E <sub>m</sub>	16,7 ± 0,71	0,049 ± 0,054	-5,65 ± 3,26
G <sub>m</sub>	81,9 ± 17,43	0,239 ± 0,056	-0,50 ± 0,36
H <sub>m</sub>	108,0 ± 14,98	0,215 ± 0,038	-4,73 ± 1,15
I <sub>m</sub>	64,4 ± 26,07	0,198 ± 0,011	-4,63 ± 1,05

\*DP: Desvio Padrão

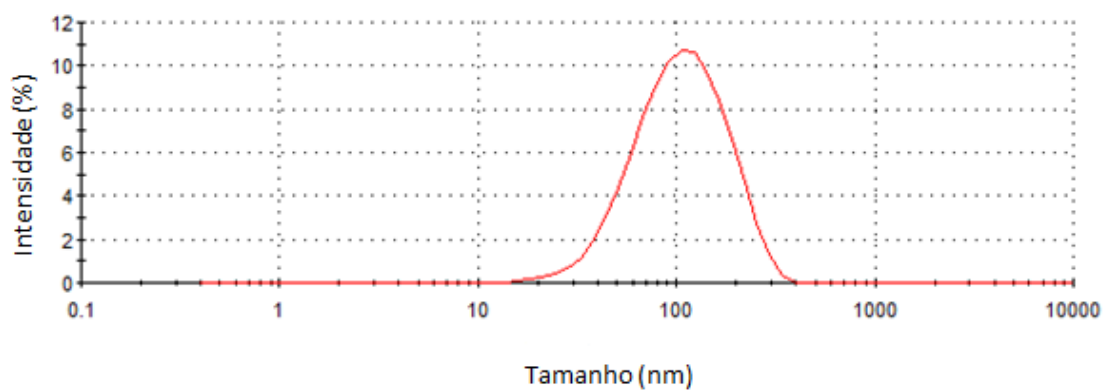
O PDI é um indicador de estabilidade e distribuição de tamanho das gotículas. Seu valor varia de 0,0 a 1,0. Quanto maior o PDI, menor a uniformidade entre o tamanho de gotículas (PATEL *et al.*, 2012), e, inversamente, quanto mais próximo de zero, maior a homogeneidade de tamanho entre as gotículas (MOGHIMIPOUR; SALIMI; EFTEKHARI, 2013). Pode-se observar que todas as MEs apresentaram excelente homogeneidade de tamanho entre as gotículas de um mesmo sistema (Tabela 4.3 e Figuras 4.6 a 4.10).



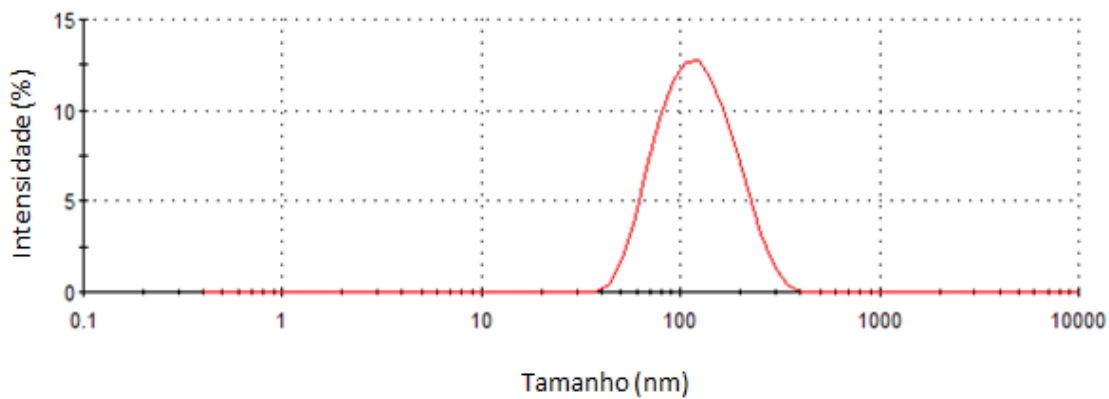
**Figura 4.6.** Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Bm.



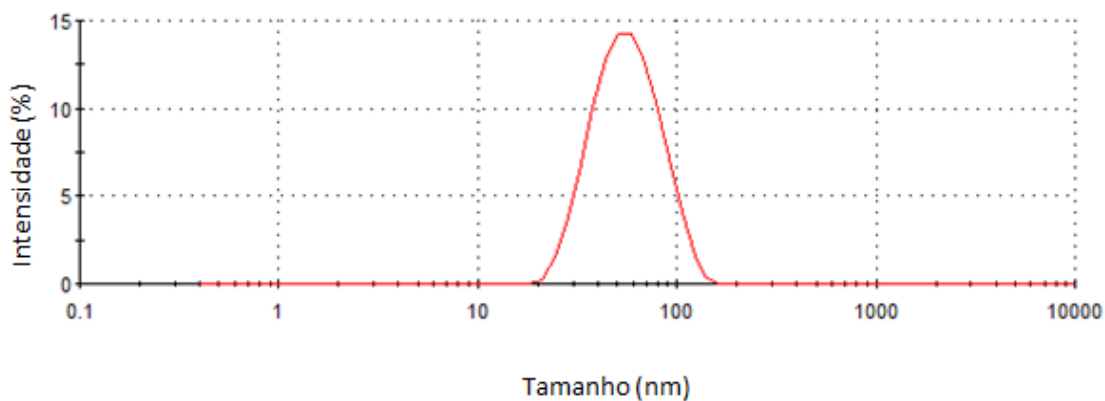
**Figura 4.7.** Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Em.



**Figura 4.8.** Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Gm.



**Figura 4.9.** Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Hm.



**Figura 4.10.** Distribuição do tamanho das gotículas pela intensidade da ME Im.

Nas emulsões clássicas, que são sensíveis aos fenômenos de instabilidade, valores de potencial Zeta extremamente positivos ou negativos indicam o predomínio de forças repulsivas entre as gotículas, diminuindo a probabilidade de coalescência e separação entre as fases (FAZULLIN; MAVRIN; SHAIKHIEV, 2015). No caso das MEs, esse fator não é tão relevante, visto que são sistemas termodinamicamente estáveis.

A Tabela 4.3 mostra que o potencial Zeta da maioria das formulações foi próximo de zero, indicando ausência de carga entre as gotículas, o que é condizente, uma vez que as gotículas estavam revestidas por tensoativos não-iônicos. Baixos valores de potencial Zeta também foram encontrados por Pakkang e colaboradores (2018), que utilizaram tensoativos não iônicos (Span® 80 e Dehydol® LSTH) no preparo de suas MEs A/O, as quais continham água e mistura de óleo de mamona e óleo de girassol em proporções de 1:9 a 5:5, obtendo valores de potencial zeta de -2, -5 e - 7 mV.

A fase dispersante em sistemas emulsionados pode ser determinada, dentre outros métodos, pela medida da condutividade elétrica. A condutividade medida para as cinco MEs variou de 47,2 a 76,8  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Tabela 4.4), com valores progredindo de acordo com a quantidade de água presente na formulação. Estes valores confirmam que todas as formulações caracterizadas tratam-se de MEs do tipo O/A. Lv e colaboradores (2017) prepararam MEs O/A contendo óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Eugenia caryophyllus* e *Rosmarinus officinalis* num sistema composto por Cremophor® EL, 1,2 propanodiol e óleos essenciais (47:23:30 p/p) como formulações modelo. Os pesquisadores obtiveram condutividades elétricas de 60,0  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (ME com *M. piperita*), 89,4  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (ME com *E. caryophyllus*) e 185,6  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (*R. officinalis*).

**Tabela 4.4.** Valores de índice de condutividade elétrica e pH das formulações Bm, Em, Gm, Hm e Im.

Amostras	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	pH
	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$
B <sub>m</sub>	50,3 $\pm$ 4,3	4,33 $\pm$ 0,06
E <sub>m</sub>	47,2 $\pm$ 3,7	4,45 $\pm$ 0,02
G <sub>m</sub>	55,7 $\pm$ 4,9	4,39 $\pm$ 0,29
H <sub>m</sub>	76,8 $\pm$ 6,0	4,13 $\pm$ 0,26
I <sub>m</sub>	49,1 $\pm$ 5,6	4,69 $\pm$ 0,34

\*DP: Desvio Padrão

A determinação do pH das formulações medicamentosas e cosméticas é importante para avaliar a compatibilidade com os tecidos do local da aplicação. No caso do presente estudo, os sítios alvos são a pele e seus anexos, que possuem pH levemente ácido, tendo a pele uma variação de pH entre 4,6 e 5,8 (em geral abaixo de 5,0), variando conforme a região do corpo ou a idade, enquanto o pH da superfície da unha fica em torno de 5,0 e do interior da unha é de aproximadamente 4,7. Tal acidez contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em suas superfícies (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002; LAMBERS *et al.*, 2006; MURDAN; MILCOVICH; GORIPARTHI, 2011).

Todas as formulações apresentaram pH ligeiramente ácido, entre 4,69 e 4,13, mas, ainda assim, próximo ao pH da pele. A *C. albicans* é capaz de crescer em meios que variam de pH 2,0 a pH 10,0 e sua adaptação ao pH ambiental é fundamental para a patogenicidade desta levedura (SHERRINGTON *et al.*, 2017). No caso do *T. rubrum*, o pH viável para seu crescimento é de 4,0, podendo até mesmo sobreviver em pH ambiental  $\geq 3,5$ , tendo sido demonstrado por alguns que esse dermatófito consegue se adaptar em pH mais alcalino (FERREIRA-NOZAWA *et al.*, 2003; CHEUNG *et al.*, 2014).

Diante disto, apesar dos fungos terem essa propriedade de se adaptarem ao pH do meio, ficou demonstrado, no Capítulo 3, que as MEs testadas conseguiram inibir totalmente o crescimento de suas células numa faixa de pH mais ácida, de 4,69 a 4,13, tendo permanecido eficazes e dentro de um valor de pH que não agrediria a pele e seus anexos, já que o pH alcalino é o principal responsável pelo potencial irritante e desidratante da pele (BEZERRA *et al.*, 2016).

Como demonstra a Tabela 4.5, a ausência de citotoxicidade era esperada, uma vez que os constituintes são conhecidos e de amplo uso em medicamentos e cosméticos devido à baixa toxicidade. Nenhuma das amostras apresentou toxicidade nas concentrações testadas, assim como não foram capazes de inibir 50% das células. Apenas o fármaco de morte doxorrubicina apresentou citotoxicidade com valor de  $CI_{50\%}$  2,121  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Tabela 4.5.** Valores de viabilidade celular do óleo essencial e das MEs testados na linhagem MRC-5, após 24 horas de exposição. Os dados estão representados como  $CI_{50\%}$  (intervalo de confiança de 95%).

Amostras	$CI_{50\%} \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Intervalo de confiança)
B <sub>m</sub>	>50
E <sub>m</sub>	>50
G <sub>m</sub>	>50
H <sub>m</sub>	>50
I <sub>m</sub>	>50
* <i>M. officinalis</i>	>50
Doxorrubicina	2,121 (1,713 – 2,625)

\*Óleo essencial de *M. officinalis*

A literatura comprova que os tensoativos e cotensoativos utilizados nas formulações das MEs testadas, bem como o óleo essencial da *M. officinalis*, não são substâncias potencialmente citotóxicas.

O álcool isopropílico teve sua citotoxicidade avaliada por Nordin e colaboradores (1991) em células de fibroblasto de camundongo (L929) e apresentou  $CI_{50\%}$  de  $24.040 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , demonstrando que este álcool necessita de uma elevada concentração para ser tóxico. Por outro lado, o álcool etílico demonstrou-se tóxico em uma concentração de  $31,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à células de fibroblastos, conforme estudo realizado por Gerosa e seus colaboradores (1996). Contudo, ele não foi tóxico na composição da formulação G<sub>m</sub>.

Czajkowska-Kośnik e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade dos tensoativos Cremophor® EL, Tween® 20 e Tween® 80 frente à linhagem de fibroblasto humano em solução aquosa e obtiveram valores de  $CI_{50\%}$  correspondentes a  $67.700 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $70.800 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $65.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, tendo o Tween® 80 se mostrado ligeiramente mais tóxico em relação aos outros. Além disso, tais resultados demonstram que esses tensoativos só apresentam toxicidade em concentrações bem mais elevadas do que  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , dados que corroboram com os resultados do presente estudo.

Com relação ao óleo essencial de *M. officinalis*, o estudo de Costa e colaboradores (2016) verificou que sua  $CI_{50\%}$  esteve numa faixa de  $250$  a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à linhagem de fibroblasto murino (NCTC clone 929), dado que corrobora com o resultado do presente estudo onde o óleo não foi tóxico na concentração testada de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $CI_{50\%} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Com base nas MEs desenvolvidas e caracterizadas, a formulação considerada como a melhor dentre todas foi a formulação  $G_m$ , pois apresentou um ótimo resultado de caracterização físico-química, com viscosidade correspondente a 10,43 cP, índice de refração de 1,380, transmitância de 99,50%, condutividade elétrica de 55,7  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , o tamanho de suas gotículas foi de 81,9 nm com PDI de 0,239, o potencial zeta foi de -0,50mV e o pH da formulação foi de 4,39. Além disso,  $G_m$  não foi tóxica e apresentou atividade antifúngica frente às cepas de *T. rubrum* e *C. albicans* com CIM de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Entretanto, a  $H_m$  também apresentou bons parâmetros e, por isso, pode ser considerada como outra boa opção de ME, já que apresentou viscosidade correspondente a 9,0 cP (um pouco inferior ao da  $G_m$ ), seu índice de refração foi de 1,379, a transmitância foi de 99,23% e sua condutividade elétrica foi de 76,8  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , já que sua formulação tinha um percentual maior de água do que a formulação  $G_m$ . O tamanho de suas gotículas foi de 108,0 nm, demonstrando-se maiores do que as de  $G_m$  e com PDI de 0,215 próximo ao valor de  $G_m$ , o que indicou uma boa uniformidade entre os tamanhos das gotículas de ambas as formulações. O potencial Zeta foi de -4,73 mV, o seu pH, de 4,13 e  $H_m$  também não foi tóxica às células de fibroblasto humano. A atividade antifúngica de  $H_m$  frente às cepas de *T. rubrum* e *C. albicans* apresentou CIM de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , demonstrando menor atividade que a  $G_m$ , porém, ainda assim, teve uma boa ação fungicida.

Por fim, os testes de caracterização ratificaram que as formulações  $G_m$  e  $H_m$  apresentaram valores muito próximos, indicando que são formulações O/A estáveis e apropriadas para uso tópico na pele e unhas. Além disso, o teste de citotoxicidade confirmou que se tratam de MEs não tóxicas ao ser humano, enquanto o teste de susceptibilidade antifúngica demonstrou que ambas as formulações possuem expressiva atividade antifúngica contra os patógenos testados. Portanto, fica evidente que ambas as MEs  $G_m$  e  $H_m$  são promissoras para serem utilizadas no tratamento tópico de onicomicoses causadas por *T. rubrum* e *C. albicans*.

#### 4.4 REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. JR.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- ASCHINGER, A.; WINTER, J. The application of dynamic light scattering to complex plasmas. **New Journal of Physics**, v. 14, n. 9, p. 1-25, 2012.
- ASSIS, A. K. T. **Os fundamentos experimentais e históricos da eletricidade**. v. 2. Canadá: Apeiron Montreal, 2018. 48p.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 90-92p.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 95-98p.
- AZEEM, A.; KHAN, Z. I.; AQIL, M.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; TALEGAONKAR, S. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 35, n. 5, 525–547, 2009.
- BRASEQ. Tecnologia na medida certa. Medidor de índice de refração. Disponível em: <<https://www.braseq.com.br/medidor-indice-refracao>> Acesso: 26 set. 2018.
- BEZERRA, P. X.; SOUZA, J. B. P.; CARMO, E. S.; LUIS, J. A. S. Avaliação da rotulagem e parâmetros de qualidade de sabonetes íntimos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 1, p. 51-60, 2016.
- CADOGAN, S. P.; HAHN, C. J.; RAUSCH, M. H.; FRÖBA, A. P. Study on the applicability of dynamic light scattering (DLS) to microemulsions including supercritical carbon dioxide-swollen micelles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 499, p. 202-208, 2017.
- CARVALHO, P. M.; FELÍCIO, M. R.; SANTOS, N. C.; GONÇALVES, S.; DOMINGUES, M. M. Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 237, p. 1-17, 2018.
- CHEUNG, Y.Y.; LEE, S. H. C.; HUI, M.; LUK, T. N. M. Effect of pH on fungal growth: problems with using vinegar (5% acetic acid) in treating superficial fungal infections. **Hong Kong Journal of Dermatology & Venereology**, v. 22, n. 2, p. 57-64, 2014.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 1-8p.
- COSTA, A. R.; PEREIRA, P. S.; BARROS, L. M.; DUARTE, A. E.; GOMEZ, M. C. V.; ROLÓN, M.; VIDAL, C. A. S.; MAIA, A. J.; BRAGA, M. F. B. M.; COUTINHO, H. D. The cytotoxicity activity and evaluation of antiprotozoa *Melissa officinalis* L. (cidro-melisa). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 21, n. 4, p. 1-14, 2016.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; WOLSKA, E.; CHORAŻEWICZ, J.; SZNITOWSKA, M. Comparison of cytotoxicity in vitro and irritation in vivo for aqueous and oily solutions of surfactants. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 8, p. 1232-1236, 2015.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2018.

DUBIN, S.; ZIETZ, S.; GABRIEL, K. L. Statistical analysis of dynamic light scattering data from biological materials: sources of variability. Conferences. In: PROCEEDINGS OF THE IEEE 26TH ANNUAL NORTHEAST BIOENGINEERING CONFERENCE (CAT. NO.00CH37114), 2002, Storrs. Conferences. Storrs: IEEE, 2002. p. 23. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/842360>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

FAZULLIN, D. D.; MAVRIN, G. V.; SHAIKHIEV, I. G. Particle size and zeta potential changes in the disperse phase of water-emulsified waste waters in different treatment stages. **Chemistry and Technology of Fuels and Oils**, v. 51, n. 5, p. 501-505, 2015.

FERREIRA-NOZAWA, M. S.; NOZAWA, S. R.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 161-164, 2003.

FLORENCE A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed. São Paulo: USP, 2003. 732p.

GEROSA, R.; BORIN, M.; MENEGAZZI, G.; PUTTINI, M.; CAVALLERI, G. In vitro evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 10, p. 532-534, 1996.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 396-397p.

HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. **Food Research International**, v. 27, n. 2, p. 195-198, 1994.

KHAN, A. Y.; TALEGAONKAR, S.; IQBAL, Z.; AHMED, F. J.; KHAR, R. K. Multiple emulsions: an overview. **Current Drug Delivery**, v.3, n. 4., p. 429-43, 2006.

KUMAR, A.; KUSHWAHA, V.; SHARMA, P. K. Pharmaceutical microemulsion: formulation, characterization and drug deliveries across skin. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 6, n. 1, p. 1-21, 2014.

KUMAR, P.; MITTAL, K. L. **Handbook of microemulsion science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. 389p.

LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, A.; FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 5, p. 359-370, 2006.



LANGEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**, v.21, n. 7, p. 255-260, 1988.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 175–193, 2012.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LU, G. W.; GAO, P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. In: KULKARNI, V., editor. **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems**. USA: Elsevier, 2010. 65p.

LV, X.; LIU, T.; MA, H.; TIAN, Y.; LI, L.; LI, Z.; LI, Z.; GAO, M.; ZHANG, J.; TANG, Z. Preparation of essential oil-based microemulsions for improving the solubility, ph stability, photostability, and skin permeation of quercetin. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3097-3104, 2017.

MASSON, A. O.; LOMBELLO, C. B. Metodologias de avaliação citotóxica: estudo comparativo segundo tempo de exposição. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 9., 2016, Foz do Iguaçu. Anais eletrônicos - 9º COLAOb. Disponível em: <[http://slabo.org.br/cont\\_anais/anais\\_9\\_colaob/manuscript/13-032TT.pdf](http://slabo.org.br/cont_anais/anais_9_colaob/manuscript/13-032TT.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2018.

MISHRA, A.; PANOLA, R.; RANA, A. C. Microemulsions: as drug delivery system. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 467-474, 2014.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 63-71, 2013.

MURDAN, S.; MILCOVICH, G.; GORIPARTHI, G. S. An assessment of the human nail plate pH. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 4, p. 175-181, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NORDIN, M.; WIESLANDER, A.; MARTINSON, E.; KJELLSTRAND, P. Effects of exposure period of acetylsalicylic acid, paracetamol and isopropanol on L929 cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 5-6, p. 449-450, 1991.

PAKKANG, N.; URAKI, Y.; KODA, K.; NITHITANAKUL, M.; CHAROENSAENG, A. Preparation of water-in-oil microemulsion from the mixtures of castor oil and sunflower oil as makeup remover. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 1, n. 6, p. 809-816, 2018.

PARTICULAR SCIENCE. Zetasizer. Disponível em: <<https://bit.ly/2TUhWgm>> Acesso em: 26 set. 2018.

PATEL, Z. B., PATEL, K. S.; SHAH, A. S.; SURTI, N. I. Preparation and optimization of microemulsion of rosuvastatin calcium. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 118-119, 2012.

PAUL, B. K.; MITRA, R. K.; MOULIK, S. P. Microemulsions: percolation of conduction and thermodynamics of droplet clustering. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 301-367, 2007.

PTL. Particle Technology Labs. Dynamic Light Scattering. Disponível em: <<https://particletechlabs.com/analytical-testing/particle-size-distribution-analyses/dynamic-light-scattering>> Acesso em: 26 set. 2018.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v.12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RAKSHIT, A. K.; MOULIK, S. P. Physicochemistry of w/o microemulsions: formation, stability, and droplet clustering. Cap. 2. In: FANUN, M. **Microemulsions: properties and applications**. Surfactant science series. Volume 144. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009, 18p.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Revista de Cosmiatria & Medicina Estética**, v. 5, n. 2, p. 26-35, 1997.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS NETO, A. A.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: Uma abordagem básica e perpesctivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, p. 45-66, 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria – fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Editora Artliber, 2006. 240 p.

SCOOT, H. Reology. In: REMINGTON, J.P., ed. **The science and practice of pharmacy**. Philadelphia: Lippincott, 2000. 335-335p.

SHERRINGTON, S. L.; SORSBY, E.; MAHTEY, N.; KUMWENDA, P.; LENARDON, M. D.; BROWN, I.; BALLOU, E. R.; MACCALLUM, D. M.; HALL, R. A. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1-28, 2017.

SINKO, P. J. **Físico-química e ciências farmacêuticas**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 123-579p.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; CARLSON, S. L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. **Brain Research Protocol**, v. 2, n. 4, p. 259-263, 1998.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

WIKIPEDIA. Dynamic light scattering. An example of Dynamic Light Scattering. 2010. Disponível em: <<https://bit.ly/2TV7hlw>> Acesso em: 26 set. 2018.

WOOD, J. H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L. J. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. v.1. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 210-253p.

ZHANG, Y.; YANG, M.; PORTNEY, N. G.; CUI, D.; BUDAK, G.; OZBAY, E.; OZKAN, M.; OZKAN, C. S. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. **Biomed Microdevices**, v. 10, n. 2, p. 321-328, 2008.

ZHI-JUN, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR AHMED, S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 210, n. 1, p. 25-39, 1997.

ŽILIUS, M.; RAMANAUSKIENĖ, K.; JUŠKAITĖ, V.; BRIEDIS, V. Formulation of propolis phenolic acids containing microemulsions and their biopharmaceutical characterization. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

## CONCLUSÕES

- Em relação ao teste de susceptibilidade antifúngica, dentre os oito óleos essenciais avaliados, os que demonstraram melhor atividade antifúngica frente às cepas de *T. rubrum* e *C. albicans* foram os óleos de *M. officinalis* e *C. citratus*, entretanto, o óleo essencial de *M. officinalis* foi o mais ativo contra ambos os patógenos.
- O propilenoglicol foi o único insumo que se mostrou totalmente imiscível nos óleos essenciais de *M. officinalis* e *C. citratus*, em todas as proporções.
- O ácido oleico demonstrou ser capaz de formar maior região de ME que o miristato de isopropila, quando combinado a um surfactante não iônico (Kolliphor<sup>®</sup> EL), álcool etílico e água. Além disso, foi capaz de formar regiões de emulsão clássica e gel.
- A construção dos diagramas de fases pseudoternários possibilitou avaliar que os tensoativos não iônicos Tween<sup>®</sup> 20, Tween<sup>®</sup> 80 e Kolliphor<sup>®</sup> EL combinados a álcoois de cadeia curta (isopropílico e etílico), com o ácido oleico e a água, apresentaram regiões de MEs mais extensas na razão C/T de 1:1 do que quando se utilizava como cotensoativo o Transcutol<sup>®</sup> P.
- O teste de avaliação da atividade antifúngica de MEs bases, confirmou-se o fato de que as MEs por si só já apresentam certa atividade antimicrobiana, e, no caso do presente estudo, o *T. rubrum* se mostrou mais susceptível à MEs bases do que a *C. albicans*.
- As MEs contendo apenas um óleo essencial foram mais ativas do que aquelas que continham a mistura dos óleos de *M. officinalis* e *C. citratus* e, ainda, a ME mais ativa contra ambos os fungos foi a G<sub>m</sub>, que teve em sua composição, além do óleo de *M. officinalis* e da água, Tween<sup>®</sup> 20 e álcool etílico.
- No teste de citotoxicidade, todas as mostras de ME avaliadas foram atóxicas, bem como o óleo essencial de *M. officinalis* isolado. Além disso, a caracterização físico-química demonstrou que as MEs G<sub>m</sub> e H<sub>m</sub> foram as mais estáveis e promissoras para o uso tópico no tratamento de onicomicoses causadas por *T. rubrum* e *C. albicans*.