



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA (CITA)**

**ÓLEO ESSENCIAL DA *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil:
CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO
E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

CLEYTON ASSIS LOUREIRO DE SOUZA

**RIO BRANCO
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA (CITA)**

**ÓLEO ESSENCIAL DA *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil:
CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO
E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

CLEYTON ASSIS LOUREIRO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), da Universidade Federal do Acre (UFAC), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica

Orientador Prof./Pesquisador Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Coorientador Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria

**RIO BRANCO
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

S729o Souza, Cleyton Assis Loureiro de, 1972-
Óleo essencial da *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil:
caracterização desenvolvimento e estudo da atividade antibacteriana /
Cleyton Assis Loureiro de Souza. – 2015.
110 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de
Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Rio
Branco, 2015.

Inclui Referências bibliográficas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortado Ruiz Rodriguez.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de
Faria.

1. Plantas medicinais. 2. *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil. 3. Óleo
essencial. 4. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDD: 581.634

Bibliotecária: Vivyanne Ribeiro das Mercês Neves CRB-11/600



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA (CITA)**

CLEYTON ASSIS LOUREIRO DE SOUZA

**ÓLEO ESSENCIAL DE *CINNAMOMUM HATSCHBACHII* VATTIMO-GIL:
CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO E ESTUDO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18/11/2015

Professor Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez
Universidade Federal do Acre (UFAC)

Professor Dr. Robinson Viana Figueroa Cadillo
Universidade Federal de Rondônia (UNIR-Avaliador Externo)

Professora Dr^a. Shirani Kaori Haraguchi
Universidade Federal do Acre (UFAC)

Dedico este trabalho a todos aqueles me deram força para concluir os meus objetivos, a minha mãe Miriam Selma Loureiro de Souza, meu pai Francisco de Assis Nogueira de Souza (*in memoriam*) minha esposa Clara Rúbia Pinheiro de Souza e a meus filhos Clara Lis Pinheiro de Souza e Orion Assis Pinheiro de Souza pelo imenso apoio.

AGRADECIMENTO

Ao orientador Professor Doutor Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez e ao coorientador Professor Doutor Fernando Sergio Escócio Drummond Viana de Faria pelas orientações e incentivo para conclusão desta qualificação.

À Universidade Federal do Acre (UFAC), que vem promovendo o meu crescimento profissional desde a graduação. E ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (PPG-CITA), ao Grupo de Pesquisa de Nanociência, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia (N&N&Nb) e Microbiologia que compõem o Complexo BIONORTE, ao Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal (LABEV) da Universidade Federal do Acre (UFAC), aos Laboratórios de Nanobiotecnologia, Biologia e Química da Universidade de Brasília (UnB) e ao Laboratório de Física do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre (IFAC), bem como aos técnicos dos laboratórios Anderson Luís Ramos (UFAC) e Karen Rapp Py-Daniel (UnB) e respectivas equipes.

Aos professores das diferentes disciplinas do mestrado, todos eles contribuíram com elevados conhecimentos e incentivos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do curso de Ciências da Natureza com habilitação em Física (2001), colegas da turma 2013 do PPG-CITA e colegas de trabalho do IFAC.

À Professora Doutora Clarice Maia Carvalho, Coordenadora do PPG-CITA, pelas análises antibacterianas.

Ao Márcio Lima Dumond secretário do PPG-CITA que sempre prestativo ajudou em vários momentos de estudo e pesquisa.

Ao Dr. Igor Anatolievich Degterev pelas orientações nas medidas espectroscópicas e correções.

A Professora Claudia Ferreira de Almeida pelas orientações, correções e colaboração profissional.

Ao colega Antônio Oliveira da Costa pelo apoio e orientação nas análises de espectroscopia.

Ao colega Jason Jerry Atoche Medrano pelo acolhimento e contatos na UNB.

Ao Instituto de Química da UnB (IQ-UnB) pelas medidas de RMN e ao Dr. Raine Garrido do *Center of Biomolecular Chemistry*, Havana, Cuba, pela ajuda nas análises e interpretação dos espectros de RMN.

Ao Professor José Janilson Amorim da Silva pelas orientações nas traduções de textos.

Ao Professor Roberto Augusto Rocha Guimarães pelas orientações na Química.

A Professora Doutora Shirani Kaori Haraguchi pelas orientações e correções do trabalho.

Ao eterno Professor Mestre Jose Carlos de Oliveira (PONCIANO) e aos Amigos Professores Doutores Luiz Eduardo Pedroso, Delcio Dias Marques, pelos conselhos e orientações que me guiam desde o início da minha carreira profissional.

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.”
Carl Sagan

“Para uma tecnologia de sucesso, a realidade deve ter prioridade sobre as relações públicas, pois a Natureza não pode ser enganada.”
Richard Feynman

RESUMO

O conhecimento e a utilização de plantas medicinais para tratamento e cura de doenças pelo homem é milenar. Muitas comunidades pelo mundo, independentemente do nível social ou econômico, ainda hoje, mantém, não só vivo esses conhecimentos, como o passam de geração a geração. A Canela, Canela-da-Índia ou Canelão, do gênero *Cinnamomum*, da família das Lauráceas é conhecida tradicionalmente como planta medicinal. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi obter o óleo essencial da canela, realizar sua caracterização físico-química e análise espectroscópica, bem como produzir nanoemulsão com ele para análise da atividade antibacteriana. O óleo foi obtido das folhas da planta *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil por meio de hidrodestilação e teve um rendimento médio de 0,71%, seu índice de refração médio foi 1,5769 a 27,6 °C, tendo sido considerado ácido pois o índice de pH médio obtido foi 5,89. O óleo essencial de cor amarelada e aparência transparente teve sua densidade média calculada em 1,0230 g.ml⁻¹. Com o óleo essencial da canela foi possível produzir sistemas nanoemulsionados utilizando o método de ultrassonicação desenvolvidos a partir de formulações com EHL variando de 8,0 a 15 obtidas a partir dos tensoativos Span 80 e Twenn 80 que, após testes, mostraram-se com boa estabilidade. As medidas e análises espectroscópicas de UV-Vis, IV-TF, RMN-TF e CG-MS, determinaram que o óleo essencial da canela é formado por uma mistura de compostos químicos dentre os quais indentificou-se hidrocarbonetos dos grupos alcanos, alquenos, aldeídos, tais como: 3-fenil-2-propenal (36,69 %); acetato de 2-fenil-propila (20,60%); benzoato de benzila (13,40%); 3-fenil-propanal (3,33%); Cinamaldeído (3,13%); 3-fenil-propeno (2,26%); *p*-isopropil-tolueno (1,93%); benzaldeído (1,72%); α -pineno (1,12%); linalol (0,77%); α -terpineol (0,72%); canfeno (0,59%). Quanto aos resultados experimentais do *ZetaSizer* observou-se que todas as formulações com EHLs distintos formaram sistemas nanoemulsionados levando em consideração o tamanho, índice de polidispersividade e potencial *Zeta*, e que as obtidas com EHL 9, 10, 11 e 12 indicaram melhor qualidade. Nas análises antibacteriana com o óleo essencial e sistemas nanoemulsionados contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, verificou-se maior atividade contra a *Escherichia coli* em relação às nanoemulsões testadas e o OECHVG apresentou melhor atividade contra a *Streptococcus pneumoniae*.

Palavras-chave: *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil. Óleo Essencial. Nanoemulsão. Espectroscopia. Atividade Antibacteriana.

ABSTRAT

The knowledge and the use of medicinal plants for treating and curing diseases by mankind derive from millennia. A lot of communities around the world, independently on their social or economical level, still today, keep not only this knowledge alive, but they also pass it on from generation to generation. The Cinnamon, Indian Cinnamon or “Canelão” in Brazil, of the genus *Cinnamomum*, of the Lauraceae family, is traditionally known as a medicinal plant. Based on this, the objective of this work was to obtain the essential oil from Cinnamon to accomplish its physiochemical characterization and spectroscopic analysis, as well as to produce nanoemulsion with it to analyze the microbiologic activity. The oil was obtained from the leaves of the plant through hydrodistillation and the average outcome was 0,71 %, its average refraction rate was 1,5769 at 27,6 °C, which had been considered acid because the average pH obtained rate was 5,89. The yellowish and transparent appearance oil had its average density calculated to 1,0230 g.ml⁻¹. With the cinnamon essential oil, it was possible to produce nanoemulsion systems, using the ultrasonification method, developed from the formulations with EHL varying from 8,0 to 15, which were obtained from the surfactants Span 80 and Twenn 80 that, and after trials, they showed good stability. The spectroscopic measurements and analyses of UV-VIS, IR-TF, RMN-TF and CG-MS, had determined that the essential oil of the cinnamon is formed by a mixture of chemical compositions, and among them are hydrocarbons of the groups: alkanes, alkenes, aldehydes, such as: 3-phenyl 2-propenal (36,69%); acetate de 2-fenil-propila (20,60%); benzyl benzoate (13,40%); 3-fenil-propanal (3,33%); cinnamaldehyde (3,13%); 3-fenil-propeno (2,26%); p-isopropil-tolueno (1,93%); benzaldehyde (1,72%); α -pinene (1,12%); linalool (0,77%); α -terpineol (0,72%); camphene (0,59%). As for the results of ZetaSizer, it was observed that all of the formulations with different EHLs had formed nanoemulsion systems taking into account the size, polydispersion rate and zeta potential, and that those ones obtained with EHL 9, 10, 11 and 12, had indicated better quality. In the microbiological analysis with the essential oil and nanoemulsion systems against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, a larger activity was verified against the *Escherichia coli* in relation to the tested nanoemulsões and OECHVG presented better activity against the *Streptococcus pneumoniae*.

Key Words: Vattimo-Gil *Cinnamomum hatschbachii*. Essential oil. Nanoemulsion. Spectroscopy. Microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore da <i>Cinnamomum hatschbachii</i>	26
Figura 2 – Canela em casca e pó.....	26
Figura 3 – Localização de extração do material botânico.....	41
Figura 4 – Folhas, fruto e amostras de folhas da <i>Cinnamomum hatschbachii</i>	42
Figura 5 – Seleção de folhas da <i>Cinnamomum hatschbachii</i>	43
Figura 6 – Lavagem e secagem das folhas.....	43
Figura 7 – Secagem das folhas da <i>Cinnamomum hatschbachii</i>	44
Figura 8 – Trituração das folhas da <i>Cinnamomum hatschbachii</i>	44
Figura 9 – Processamento das folhas da canela trituradas para extração do OECHVG.....	45
Figura 10 – Processo de extração do OECHVG.....	46
Figura 11 – Centrifugação.....	46
Figura 12 – Refratômetro de bancada.....	48
Figura 13 – Determinação do índice de pH do OECHVG.....	49
Figura 14 – Espectrômetro UV-Vis.....	50
Figura 15 – Espectroscopia IV-TF do OECHVG.....	51
Figura 16 – Cromatógrafo CG-MS.....	52
Figura 17 – Amostras preparadas para o CG-EM.....	53
Figura 18 – Nanoemulsificação.....	55
Figura 19 – Cor do OECHVG.....	62
Figura 20 – Aparência do OECHVG.....	63
Figura 21 – Aparência dos sistemas emulsionados com EHL de 8 a 15.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dimensão das partículas, aparência e estabilidade por classificação do sistema emulsionado.....	34
Tabela 2 – Concentrações e diluições do OECHVG no CG-EM.....	53
Tabela 3 – Características dos tensoativos utilizados nas formulações	55
Tabela 4 – Massas dos tensoativos para formulações de diferentes EHL Final.	56
Tabela 5 – Composição das formulações para estudo do EHL Final – 10 % de tensoativos. ...	57
Tabela 6 – Rendimento do OECHVG.....	60
Tabela 7 – Rendimento do OE Cinnamomum descrito na literatura científica	60
Tabela 8 – Posição e identificação das bandas observadas no IV-TF do OECHVG.....	66
Tabela 9 – Identificação dos multipletos.	70
Tabela 10 – Publicações de análises de ¹ H-RMN de OE.....	72
Tabela 11 – Identificação dos compostos por meio do CG-EM.	74
Tabela 12 – Compostos encontrados na literatura.	80
Tabela 13 – Picos não identificados.....	81
Tabela 14 – Formulações/EHL, Tamanho, IPD e Potencial Zeta.	88
Tabela 15 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da Staphylococcus aureus.....	90
Tabela 16 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a Staphylococcus aureus.....	91
Tabela 17 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da Streptococcus pneumoniae.....	91
Tabela 18 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a Streptococcus pneumoniae	92
Tabela 19 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da Escherichia coli	92
Tabela 20 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a Escherichia coli.....	93
Tabela 21 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da Klebsiella pneumoniae.....	94
Tabela 22 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a Klebsiella pneumoniae	94
Tabela 23 – Probabilidade estatística de diferença de tratamento com o uso do OECHVG e das nanoemulsões.....	95

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do rendimento do OE.	47
Equação 2 - Cálculo da Densidade do OE.	49
Equação 3 - Cálculo do EHL do OE.	56
Equação 4 - Relação de massas do Span e Tween.	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Espectro UV-Vis do OECHVG	64
Gráfico 2 – Espectro IV-TF do OECHVG	65
Gráfico 3 – Espectro RMN do OECHVG – grupos funcionais por regiões	68
Gráfico 4 – Espectro RMN do OECHVG – multipletos de 0 a 6 ppm	69
Gráfico 5 – Espectro RMN do OECHVG – multipletos de 6 a 10 ppm	69
Gráfico 6 – Espectro RMN do OECHVG – integração de 0 a 6 ppm	71
Gráfico 7 – Espectro RMN do OECHVG – integração de 6 a 10 ppm	71
Gráfico 8 – Espectro RMN do OECHVG – maior área de integração	72
Gráfico 9 – Cromatograma do OECHVG	73
Gráfico 10 – Espectro de massa do 3-fenil-2-propenal	76
Gráfico 11 – Espectro de massa do Acetato de 2-fenil-propila	76
Gráfico 12 – Espectro de massa do benzoato de benzila	76
Gráfico 13 – Espectro de massa do 3-fenil-propanal	77
Gráfico 14 – Espectro de massa do cinamaldeído	77
Gráfico 15 – Espectro de massa do 3-fenil-propeno	77
Gráfico 16 – Espectro de massa do <i>p</i> -isopropil-tolueno	78
Gráfico 17 – Espectro de massa do benzaldeído	78
Gráfico 18 – Espectro de massa do α -pineno	78
Gráfico 19 – Espectro de massa do linalol	79
Gráfico 20 – Espectro de massa do α -terpineol	79
Gráfico 21 – Espectro de massa do canfeno	79
Gráfico 22 – Espectro de massa do pico 13	82
Gráfico 23 – Espectro de massa do pico 14	82
Gráfico 24 – Espectro de massa do pico 15	83
Gráfico 25 – Espectro de massa do pico 16	83
Gráfico 26 – Espectro de massa do pico 17	83
Gráfico 27 – Espectro de massa do pico 18	84
Gráfico 28 – Espectro de massa do pico 19	84
Gráfico 29 – Espectro de massa do pico 20	84
Gráfico 30 – Espectro de massa do pico 21	85
Gráfico 31 – Espectro de massa do pico 22	85
Gráfico 32 – Espectro de massa do pico 23	85
Gráfico 33 – Espectro de massa do pico 24	86
Gráfico 34 – Espectro de massa do pico 25	86
Gráfico 35 – Espectro de massa do pico 26	86
Gráfico 36 – Espectro de massa do pico 27	87
Gráfico 37 – Espectro de massa do pico 28	87
Gráfico 38 – Médias dos tratamentos para a <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Gráfico 39 – Médias dos tratamentos para a <i>Streptococcus pneumoniae</i>	91
Gráfico 40 – Médias dos tratamentos para a <i>Escherichia coli</i>	93
Gráfico 41 – Médias dos tratamentos para a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em Óleo
A/O/A	Água/Óleo/Água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIONORTE	Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal
BLU	Base Livre de Umidade
BU	Base Úmida
CCBN	Centro de Ciências Biológicas e da Natureza
CDCI3	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMS	Diferença Mínima Significativa
EHL	Equilíbrio Hidrofílico/Lipofílico
EIP	<i>Emulsion Inversion Point</i>
EM	Espectroscopia de Massa
GGMED	Gerência Geral de Medicamentos
GMEFH	Gerência de Medicamentos Isentos, Específicos, Fitoterápicos e Homeopáticos
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>
IPD	Índice de Polidispersividade
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
LABEV	Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal
LCD	Display de Cristal Líquido
MIR	Infravermelho Médio
MS	Ministério da Saúde
N&N&Nb	Laboratórios de Nanociência, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia
NIR	Infravermelho Próximo
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
O/A	Óleo em Água
O/A/O	Óleo/Água/Óleo
OE	Óleo Essencial
OECHVG	Óleo Essencial da <i>Cinnamomum hatschbachii</i> Vattimo-Gil
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i>
pZ	Potencial Zeta
RMN-TF	Ressonância Magnética Nuclear com Transformada de Fourier
RPM	Rotações por Minuto
SDBS	<i>Spectral Database for Organic Compounds</i>
TF	Transformação de Fourier
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de Retenção
UFAC	Universidade Federal do Acre
UnB	Universidade de Brasília
UNIR	Universidade Federal de Rondônia
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Homem Versus Plantas.....	21
2.2	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS NA MEDICINA	22
2.2.1	<i>CINNAMOMUM HATSCHBACHII</i> VATTIMO-GIL (CANELA).....	25
2.2.2	METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO.....	27
2.3	ÓLEO ESSENCIAL (OE).....	28
2.3.1	Utilização Terapêutica dos Óleos Essenciais	29
2.3.2	ÓLEO ESSENCIAL DA <i>CINNAMOMUM HATSCHBACHII</i> VATTIMO-GIL (OECHVG).....	31
2.4	NANOCIÊNCIA/NANOTECNOLOGIA/NANOBIOTECNOLOGIA (N&N&Nb)	32
2.5	SISTEMAS EMULSIONADOS	33
2.5.1	NANOEMULSÃO	34
2.6	MICROBIOLOGIA: BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	38
3.1.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA COLETA	39
3.1.2	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	39
3.1.2.1	Estufa Microprocessada de Secagem	39
3.1.2.2	Triturador	40
3.1.2.3	Balança Eletrônica	40
3.1.2.4	Hidrodestilador tipo Clevenger	40
3.1.2.5	Centrífuga Microprocessada.....	40
3.1.2.6	Destilador de Água	40
3.1.2.7	Homogeneizador Ultrassônico	40
3.1.2.8	Balança Analítica de Precisão.....	41
3.2	MÉTODOS	41
3.2.1	ORIGEM E COLETA.....	41
3.2.1.1	Identificação Botânica	42
3.2.2	SELEÇÃO E TRATAMENTO DAS FOLHAS DA <i>CINNAMOMUM HATSCHBACHII</i> VATTIMO-GIL	42
3.2.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>CINNAMOMUM HATSCHBACHII</i> VATTIMO-GIL (OECHVG)	44

3.2.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DO OECHVG.....	47
3.2.4.1	Determinação do Rendimento do OECHVG.....	47
3.2.4.2	Determinação do Índice de Refração do OECHVG	48
3.2.4.3	Determinação do potencial Hidrogeniônico (pH) do OECHVG	48
3.2.4.4	Determinação da Densidade do OECHVG	49
3.2.4.5	Determinação da Cor e Aparência do OECHVG	50
3.2.4.6	Espectroscopia por Ultravioleta Visível (UV-Vis) do OECHVG.....	50
3.2.4.7	Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) do OECHVG	51
3.2.4.8	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com Transformada de Fourier (¹ H-RMN-TF) do OECHVG	51
3.2.4.9	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM) do OECHVG	52
3.2.5	PRODUÇÃO E ANÁLISE DE SISTEMAS EMULSIONADOS.....	54
3.2.5.1	Produção de Sistema Nanoemulsionado.....	54
3.2.5.1.1	<i>Determinação do EHL do OECHVG</i>	55
3.2.5.2	Análise de Sistema Emulsionado	57
3.2.5.2.1	<i>Teste de Centrifugação</i>	57
3.2.5.2.2	<i>ZetaSizer.....</i>	57
3.2.5.3	Teste de Atividade Antibacteriana.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	60
4.2	RENDIMENTO DO OECHVG	60
4.3	ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO OECHVG.....	61
4.4	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH) DO OECHVG	61
4.5	DENSIDADE DO OECHVG	62
4.6	COR E APARÊNCIA DO OECHVG	62
4.7	ANÁLISE DO ESPECTRO DO UV-VIS DO OECHVG	63
4.8	ANÁLISE DO ESPECTRO DO IV-TF DO OECHVG.....	64
4.9	ANÁLISE DO ESPECTRO DE ¹H-RMN-TF DO OECHVG.....	67
4.10	ANÁLISE DO CG-EM DO OECHVG	73
4.11	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS	87
4.12	AVALIAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	89

5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças pela espécie humana se baseia na botânica, na toxicologia e na herança de conhecimentos adquiridos através de séculos, na cura e prevenção de doenças (JUNIOR *et al.*, 2005).

Na maioria dos países, principalmente China, Índia e Brasil, o uso de plantas medicinais é o único recurso disponível nas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002). Segundo Junior, Pinto, Maciel, (2005), “no início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde”.

Os registros das populações pelo mundo sobre o uso terapêutico das plantas medicinais servem de indicadores importantes quanto a frequência das doses, efeitos colaterais, benefícios e indicações, apesar de não ter seus constituintes definidos (MACIEL *et al.*, 2002).

Com o avanço do desenvolvimento tecnológico, a partir do século XX, Junior, Pinto, Maciel (2005) comentam que existem obstáculos para que a população dos países em desenvolvimento tenham acesso a hospitais, postos de saúde, médicos especializados, medicamentos industrializados, além de laboratórios para exames, o que conserva a tradição popular do uso de terapias alternativas por meio das plantas medicinais.

Na atualidade, há um apelo da mídia para o uso de produtos naturais e orgânicos, informando sobre os benefícios que o consumo dos mesmos proporcionam a saúde humana. A comercialização de tais produtos, muitas vezes amparada por propagandas que certificam seus “benefícios seguros”, já que se trata de fonte natural e utilizada há milênios pela humanidade, acontece em lojas de produtos naturais, feiras livres, mercados populares, farmácias de manipulação e, em regiões mais carentes, onde as pessoas cultivam essas plantas medicinais nos quintais de suas residências (JUNIOR *et al.*, 2005; MACIEL *et al.*, 2002).

Os conhecimentos tradicionais constituem a base dos estudos científicos para a produção de medicamentos. A partir do método científico, com as descobertas e posterior isolamento dos princípios ativos majoritários contidos em óleos essenciais ou extratos produzidos das folhas, flor, frutos, sementes, caules, cascas das plantas, foi possível produzir drogas contra determinadas doenças e comercializá-las (MENDES, 2011).

Óleos essenciais e extratos de plantas podem ser extraídos de diferentes partes vitais do vegetal com aplicações na indústria de alimentos e bebidas, culinária, cosméticos, medicamentos fitoterápicos, fungicidas e larvicidas. Nos últimos anos, a Organização Mundial

da Saúde (OMS) vem se empenhando no sentido de incentivar os estudos com óleos ou extratos de plantas consideradas medicinais nas terapias alternativas (REIS, 2012).

O Brasil é considerado o país detentor da maior diversidade vegetal do planeta e apesar disso é pouco explorado. Segundo Mendes (2011), o país acaba importando quantidades consideráveis de óleos essenciais e cascas de outros países, devido à falta de cultivo comercial das diversas espécies.

A Canela é uma espécie de planta da família das Lauráceas, originária do Sri Lanka, antes conhecido como Ceilão, principal produtor e exportador da especiaria. Possui um sabor adocicado, odor suave e picante, amplamente utilizado na culinária como aromatizante (MONTEIRO, 2013). Segundo a crença popular é utilizada como estimulante, combate a flatulência, espasmos e empregado na dieta como termogênico, controla o colesterol, triglicérides e combate a diabetes.

O objetivo deste estudo foi a caracterização físico-química e espectroscópica do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil denominada popularmente como Canela, assim como a produção de nanoemulsões e avaliação antimicrobiana do óleo essencial e nanoemulsão preparadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A relação do homem com as plantas advém desde sua existência, e influencia na sobrevivência e desenvolvimento da espécie humana. Muitas plantas utilizadas pelo homem possuem finalidade medicinal, destacando-se, aqui a Canela.

2.1 HOMEM *VERSUS* PLANTAS

A relação entre o homem e o ambiente pode ser considerada bastante complexa, pois para sua sobrevivência, necessidades e conforto, utilizando-se de suas capacidades intelectuais, o homem acaba alterando o ambiente e utilizando do que necessita.

A relação do homem com as plantas não é diferente, o homem se utiliza da vegetação disponível no ambiente para diversas necessidades como moradia e alimentação, destacando-se, aqui, a função curativa.

Nesta ótica, a Etnobotânica, é a ciência que estuda a inter-relação entre diferentes culturas e plantas, avaliando o seu uso, manejo, percepção e classificação desse recurso natural para os diferentes povos (CARVALHO, 2005).

Entende-se, também, que a Etnobotânica é uma ciência interdisciplinar, pelos conceitos e metodologias de várias áreas do conhecimento, tais como a Antropologia, História, Botânica e a Farmacologia. Na Etnobotânica, todos os conhecimentos são voltados para estudar e interpretar a relação entre o contexto cultural e a utilização das plantas medicinais (CARVALHO, 2005).

Em resumo, a Etnobotânica procura estudar como a “ciência” popular utiliza as plantas medicinais, surgindo as tradições que vão passando de geração em geração e com o costume e os resultados obtidos, acabam desenvolvendo novos conhecimentos. Nesta pesquisa bibliográfica, observou-se a utilização das plantas nas comunidades, com finalidade medicinal e terapêutica nascendo a necessidade do aprofundamento das pesquisas sobre a caracterização científica dos componentes das plantas tradicionalmente utilizadas pelo homem, para se chegar a um resultado mais eficiente.

2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS NA MEDICINA

A utilização de plantas para a cura de enfermidades não é algo recente, os primeiros registros sobre o emprego de plantas na medicina feito pelo homem, data de aproximadamente 1550 a.C., resgata-se, neste aspecto, que uma das fontes de informações sobre o conhecimento dos povos da antiguidade são as escrituras (papiros) do Antigo Egito (TEIXEIRA, 2001).

O papiro mais relevante sobre o tema das plantas medicinais é o do alemão egiptólogo e romancista Georg Erbes (1837 – 1898), também conhecido como papiro de Erbes. Nele estava descrito aproximadamente 100 (cem) doenças e um número considerável de drogas de origem vegetal, animal e mineral (ARGENTA *et al.*, 2011).

Já em período menos remoto, ainda antes de Cristo, na Grécia, diversos filósofos se destacaram pela produção de obras acerca de história natural. Hipócrates (460 – 377 a.C.), por exemplo, hoje conhecido como o pai da medicina moderna, norteava suas prescrições de medicamentos, basicamente, pela natureza. Podemos citar também de um dos discípulos de Aristóteles, Teofrasto (372 a.C.), que pesquisava e produziu escritos sobre as plantas e o histórico de sua utilização, encontrando-se em suas obras, o primeiro registro da utilização da planta *Papaver somniferum* (papoula), que hoje é o princípio ativo da morfina (PINTO *et al.*, 2002).

No Brasil, a partir da sua colonização, a chegada da medicina europeia, já bem desenvolvida, se deparou e interagiu com a “medicina” indígena a partir das plantas medicinais (ARGENTA *et al.*, 2011). Dentre os primeiros cronistas que se aventuraram em obras sobre história do Brasil, vale mencionar o português, agricultor, empresário, estudioso e historiador Gabriel Soares de Souza (1540 – 1591), que chamou as plantas medicinais utilizadas pelos índios de “as árvores e ervas da virtude” (PINTO *et al.*, 2002).

Nota-se que, há muito tempo, a humanidade vem acumulando conhecimento sobre as plantas medicinais, conhecimento esse que é transmitido de geração para geração. As informações sobre o ambiente em que vive e as necessidades coletivas constituem-se nos fatores iniciais para o estudo das plantas medicinais, que, geralmente, é o único recurso disponível. E isso ainda ocorre em grande parte da população mundial, principalmente devido à falta de acesso a medicamentos industrializados, bem como por causa do seu custo (ARGENTA *et al.*, 2011).

Em países pobres ou em desenvolvimento o uso de plantas medicinais para tratamento de doenças típicas ainda é comum. A restrição no acesso a medicamentos industrializados, hospitais e laboratórios é um fator importante para que a medicina tradicional, praticada por

comunidades regionais, mantenha viva a tradição e o conhecimento sobre a flora regional. Na sua grande maioria, os produtos naturais são consumidos com pouca ou nenhuma comprovação sobre suas propriedades farmacológicas, o que pode causar um impacto na saúde de quem os consome (JUNIOR *et al.*, 2005).

No Brasil, o controle e a regulação da utilização e comercialização das plantas medicinais e seus derivados é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei n. 9.782, de 26 de janeiro 1999. A ANVISA é uma autarquia com regime especial, sob a responsabilidade do Ministério da Saúde (MS), que tem como área de atuação, não um setor específico da economia, mas todos os setores relacionados a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira. (BRASIL, 2015a).

De acordo com a Gerência de Medicamentos Isentos, Específicos, Fitoterápicos e Homeopáticos (GMEFH) da Gerência Geral de Medicamentos (GGMED) da ANVISA, as plantas medicinais são as que possuem capacidade de atuar contra enfermidades, conhecidas e utilizadas tradicionalmente por determinadas comunidades, sendo que sua utilização envolve o conhecimento sobre sua adequada colheita e preparo (BRASIL, 2015b).

De acordo com a regulamentação vigente, os medicamentos fitoterápicos industrializados devem ser registrados na ANVISA/Ministério da Saúde antes de serem comercializados.

Os fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir da utilização do chamado princípio ativo das plantas. Surgem quando a planta medicinal é industrializada por processo de padronização quantitativa permitindo maior segurança para a obtenção de um medicamento sem contaminações. No Brasil são regulamentados da mesma forma que os medicamentos convencionais e têm que apresentar critérios similares de qualidade, segurança e eficácia requeridos pela ANVISA para todos os medicamentos (BRASIL, 2015a;2015b; CARVALHO *et al.*, 2008).

Assim como qualquer medicamento, os efeitos adversos dos fitoterápicos são problemas sérios de saúde pública. O agravante é que não existe como prever a ação química desses medicamentos naturais de forma consistente, principalmente quanto à adulteração na preparação, a toxicidade, além da influência mútua com outras drogas que ocorrem frequentemente na manipulação destes produtos, fatores que são amplamente pesquisados na produção dos medicamentos industrializados. Apesar dessa preocupação possuir dados importantes para as agências de controle sanitário, as pesquisas referentes ao uso de plantas medicinais, ainda não são suficientes para o seu controle no Brasil (JUNIOR, 2008).

Quanto à utilização de plantas em funções medicinais nos seres humanos, deve-se adotar cuidados, pois as plantas podem possuir substâncias venenosas ou tóxicas para o homem, a depender da dosagem e modo de utilização.

A pesquisa das plantas medicinais pode não só colaborar para o melhor uso dos produtos fitoterápicos, como também trazer à tona o conhecimento sobre as inovações e eficácia das drogas no combate a diferentes enfermidades. (CARVALHO *et al.*, 2008). Uma das maiores biodiversidades vegetais do planeta concentra-se no Brasil e, mais da metade das espécies de plantas devem possuir propriedades ainda não conhecidas, principalmente terapêutica, com alguma utilidade às pessoas, por conta disso as pesquisas nesta área tendem a aumentar progressivamente (GUERRA *et al.*, 2007).

De acordo com Junior (2008), na Alemanha, 70 % da população pratica a denominada medicina alternativa que se baseia em plantas medicinais, incluindo os médicos, clínicos gerais, que prescrevem ervas registradas, pagas pelo seguro saúde. Apesar de tais prescrições, ainda existe a preocupação com a automedicação utilizando produtos naturais em concomitância com medicamentos industrializados, uma vez que podem provocar resultados não esperados pelos médicos.

No Brasil, regionalmente, é comum o uso de plantas medicinais em preparos de remédios caseiros para membros da família. Muitas vezes, as pessoas com maior “experiência” acabam por “receitar” para enfermidades, produtos cuja comprovação empírica tenha resultados positivos, ou que ao longo do tempo, seu uso não comprometera a saúde ou tratamento daqueles que os consumiram. É importante estudar as comunidades que utilizam as plantas para tratamento da saúde, informando-as sobre o aspecto racional em sua manipulação, coleta e uso, para que o profissional de saúde utilize a correlação de saberes científico versus popular indicando a melhor terapia às pessoas (TÔRRES *et al.*, 2005).

O tema, plantas medicinais, é bastante mencionado no meio acadêmico brasileiro. Apesar de existir um quantitativo expressivo de pesquisadores no tema, não se tem muitos investimentos no setor, comparado a outros países que faturam bilhões de dólares no mercado mundial de fitoterápicos. Como exemplo, aponta-se para o extrato da *Ginkgo biloba* que, atualmente, é um dos produtos mais comercializados no Brasil e no mundo, no entanto, a balança comercial brasileira nesse setor é deficitária (PINTO *et al.*, 2002).

2.2.1 *CINNAMOMUM HATSCHBACHII* VATTIMO-GIL (CANELA)

A família da *Lauraceae* possui mais de 350 (trezentas e cinquenta) espécies, pertencentes a 12 (doze) gêneros, que são empregados em diversas áreas de mercado, tais como: medicina popular, culinária, têxtil, marcenaria, construção civil e indústria química. Os gêneros que apresentam maior importância comercial são: *Aniba*, *Cinnamomum*, *Nectandra* e *Ocotea* (MARQUES, 2001).

Os primeiros apontamentos sobre a utilização das Lauráceas são originários da antiga Grécia. A influência grega deu origem aos nomes de muitos gêneros, por exemplo, *Laurus* L., que vem do celta “lauer” significando verde ou “laus” significando louvor, e o gênero *Phoebe*, uma alusão ao deus Apolo. (MARQUES, 2001).

Atualmente, do ponto de vista econômico, a exploração da *Lauraceae* é de grande importância na manufatura moveleira, onde suas espécies são de mais valia para mobiliários de ostentação e frutos comestíveis. Do aspecto ecológico, compreendem um enorme grupo distribuído ao longo das regiões da Mata Atlântica, Amazônica e Caatinga. Infelizmente, aliada a essa exploração vem, também, a ameaça de extinção de algumas espécies (SANTOS *et al.*, 2013).

No gênero *Cinnamomum*, que em latim significa “Canela”, há de 200 a 350 espécies, muitas das quais são produtoras de óleos essenciais. A espécie *hatschbachii* é abordada no presente estudo e foi descoberta em 1962 pela botânica Ida de **Vattimo-Gil** (1928-1993) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (MONTEIRO, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Popularmente conhecida como Canela, Canela-da-Índia ou Canelão, é uma árvore ou arbusto de 2 a 5 metros de altura (Figura 1) com cascas e folhas de aroma suave, gosto doce, levemente apimentada, amplamente empregada sob a forma de cascas e em pó, como aromatizante na culinária e na perfumaria (MONTEIRO, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).



Figura 1 – Árvore da *Cinnamomum hatschbachii*.
Legenda: (a) tronco da árvore; (b) tronco mais copa.
Foto: C. A. L. Souza.

Historicamente, antes de ser valorizada como alimento ou cosmético, a canela era utilizada como medicamento e também fazia parte de rituais religiosos. Considerada símbolo da sabedoria, a canela foi usada na Antiguidade pelos gregos, romanos e hebreus para aromatizar o vinho e com fins religiosos na Índia e na China (ALLARDICE *et al.*, 1999).

Da espécie se aproveita toda a parte aérea, sendo as folhas utilizadas para produção de óleo essencial, entretanto as partes valiosas são a casca e os ramos. O valor comercial dos óleos essenciais do gênero *Cinnamomum* depende da espécie. No mercado, é comum encontrarmos canela (Figura 2) em pó ou a casca enrolada em si mesma (MENDES, 2011).



Figura 2 – Canela em casca e pó.
Fonte: (CANELA, 2011)

Na alimentação, a canela também é utilizada em pó ou em “pau” (casca), podendo ser acrescentada a uma série de pratos, como: mingau, arroz doce, leite, café, chás, saladas de frutas e vários outros.

Já suas propriedades incluem ações antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, estimulante do sistema imunológico e circulação, adstringente, afrodisíaca, antisséptica, aperiente, aromática, carminativo, digestiva, estimulante, hipertensor, sedativa e vasodilatadora. Ainda, seus benefícios são diversos, chegando a diminuir o nível de colesterol e triglicerídeos, reduzir o nível de açúcar no sangue e auxiliar no tratamento de diabetes tipo 2 (ARGENTA *et al.*, 2011; MARQUES, 2001; MCINTYRE, 2010; MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013).

Os constituintes principais do óleo essencial de canela pertencem às classes de aldeídos, ésteres e terpenos. Como é o caso do ácido cinâmico, benzoato de benzila e pineno (MENDES, 2011; SIMÕES *et al.*, 2010).

2.2.2 METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO

Nas plantas, as funções essenciais como respiração e fotossíntese são desenvolvidas pelo chamado metabolismo primário. Já o metabolismo secundário, não é essencial para que o vegetal permaneça vivo, tanto que, já foi considerado como produtor de excreção do vegetal (WINK, 1987). Durante os processos do metabolismo primário, os componentes atuantes são distribuídos uniformemente em todas as partes do vegetal, diferentemente dos componentes que fazem parte dos processos do metabolismo secundário, que possuem concentração em determinadas partes do vegetal (CASTRO *et al.*, 2005; SANTOS, 2004).

Além disso, por não ser essencial, o metabolismo secundário não se repete em todos os seres vivos, como o primário e cada planta possui processos diferenciados, de acordo com suas condições. Assim, o metabolismo secundário realiza tarefas no que diz respeito à interação da planta com o meio externo, desempenhando funções quando ocorrem mudanças de temperatura, água, níveis de luz, competição e atração, por exemplo (CASTRO *et al.*, 2005; WINK, 1987).

Dentre as funções desses metabólicos secundários menciona-se o controle da oxidação lipídica, bem como o controle de microrganismos responsáveis pela contaminação dos alimentos (ANDRADE *et al.*, 2012).

Essa característica é bastante importante, pois a interação com fatores externos permite que os produtos de metabólitos secundários, quando extraídos, também ofereçam atividade

biológica contra determinados agentes, advindo daí, a utilização de tais produtos no comércio em áreas de agronomia, farmácia, perfumaria e alimentícia (RHODES, 1994).

É a partir do estudo e pesquisas mais aprofundadas (Química dos produtos naturais e Farmacognosia) dos produtos do metabolismo secundário que encontra-se uma atuação mais eficiente destes sobre atividades biológicas específicas. Um dos produtos do metabolismo secundário dos vegetais, utilizado para estudos, é o óleo essencial.

2.3 ÓLEO ESSENCIAL (OE)

No Brasil, o Decreto n. 55.871/1965 que conceitua óleo essencial, conforme artigo 16, como sendo um produto oleoso, extraído do vegetal, com sabor e aroma característicos e com capacidade de mudar de forma (volatilidade), também chamados de “essência natural”, “óleo etéreo” ou “essência” (BRASIL, 1965).

As plantas utilizadas no comércio e na fabricação de produtos naturais, até que seja autorizada sua disponibilização no mercado, passam por diversas pesquisas. A grande maioria dos estudos relacionados às propriedades biológicas das plantas e seus derivados, que são importantes para a indústria e o comércio, são realizados com base nos óleos essenciais. (ANDRADE *et al.*, 2012; TRANCOSO, 2013).

Os primeiros registros de obtenção dos óleos essenciais datam da época da Idade Média, pelos Árabes, por meio do processo de arrasto a vapor ou hidrodestilação. O OE pode ser extraído de diversas partes dos vegetais como: caule, casca, raízes, folhas, flores, frutos, talos ou ramos. Sua formação ocorre a partir do metabolismo secundário dos vegetais, podendo ser sintetizados pelas diversas partes que compõem a planta (botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutas, raízes, ou casca de madeira), e em qualquer de suas fases de desenvolvimento (BAKKALI *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2000; REIS, 2012).

Os OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, hexano, clorofórmio e podem ser chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos (BAKKALI *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2000; REIS, 2012).

A composição química dos óleos essenciais, concentra-se, em sua grande maioria, de derivados terpenóides. Outras características dos óleos essenciais referem-se a sua cor, sabor e estabilidade. Quanto ao sabor, os óleos essenciais, normalmente são considerados com sabor ácido e picante. No que se refere à cor, os óleos essenciais aparentam incolores ou amarelados. E, em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis quando na presença de ar, luz, calor,

umidade e outros fatores externos. As propriedades físico-químicas que auxiliam na identificação dos óleos essenciais e no seu controle de qualidade: índice de refração e atividade óptica (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Os OEs geralmente possuem aromas e bioatividades, que são características que agregam valor comercial para o estudo destes. A análise das bioatividades dos componentes de um OE inclui, principalmente, atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidantes e outras e, por isso, os estudos sobre atividades biológicas de OEs têm aumentado nos recentes anos (ATOCHE, 2014; SENHAJI *et al.*, 2007). Melo (2009), reforça a grande importância comercial e industrial e a aplicação dos óleos essenciais em diversas áreas como a perfumaria, cosmético, alimentícia, farmacêutica e terapêutica.

Outra aplicação dos óleos essenciais bastante utilizada é a de defensivos agrícolas naturais, até mesmo porque são mecanismos de defesa utilizados pela própria planta antes de sua extração. Nesta busca por produtos agrotóxicos cada vez mais eficazes, com maior eficiência e menor custo, os óleos essenciais são estudados, com a finalidade de diminuir os efeitos prejudiciais ao meio ambiente dos agrotóxicos sintéticos. No entanto, não basta a extração da essência dos vegetais, para sua utilização com algum fim terapêutico, é necessário pesquisar-lo profundamente conhecendo e isolando seus componentes, a fim de se obter resultados mais direcionados para o objetivo pretendido (TOMAZONI *et al.*, 2013).

Considerando que os óleos essenciais são encontrados em diversos tipos de vegetais e nas diversas partes que os compõem, eles podem ser extraídos das plantas por diferentes métodos, tais como Arraste por Vapor d'água, Hidrodestilação, Enfloração (Enfleurage), Extração com Solventes, Prensagem (ou expressão) e Extração por CO₂ Supercrítico. (FILIPPIS, 2001; MARTÍNEZ, 1996; SARTOR, 2009).

2.3.1 UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O óleo essencial é aplicado contra enfermidades do ser humano há mais de seis mil anos, observando-se, deste período, registros por pinturas egípcias de essências de certas partes dos vegetais (resinas, flores, folhas, sementes, raízes, etc.) sendo utilizadas na busca do bem estar físico do homem. Há, também, registros anteriores a Cristo, na China e Índia com a incorporação de óleos essenciais em “poções”. Apesar desta utilização bastante antiga, somente na Idade Média se teve a comercialização de essências aromáticas, após a utilização de processo de destilação por “cientistas” muçulmanos (TYRRELL, 1990).

Acerca do histórico da utilização dos óleos essenciais como tratamento medicinal, cita-se a obra “Kraüterburch” (1551), do alemão Alan Loncir, como sendo a primeira que fez referência sobre o tema dos óleos essenciais (SIANI *et al.*, 2000).

Atualmente tem-se uma tendência, muitas vezes movimentada pela mídia, para a utilização de produtos naturais. Os óleos essenciais possuem uma vasta aplicação além serem conhecidos tradicionalmente como fragrâncias, no entanto, é importante o desenvolvimento de mais estudos de modo a comprovar a ação biológica para aplicação na saúde humana, agroindústria e meio ambiente (BAKKALI *et al.*, 2008; CARSON *et al.*, 2002).

Dentre as diversas funções terapêuticas dos óleos essenciais, observa-se as seguintes: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódicas, expectorante, diurético. Destacando que todos os óleos voláteis são: antissépticos e estimulam a produção de glóbulos brancos do sangue, elevando a imunidade. (BAKKALI *et al.*, 2008; MCINTYRE, 2010).

No que diz respeito a combinação de fatores que contribuem para as propriedades biológicas dos óleos essenciais, lembrando da sua composição complexa, deve-se procurar saber se os seus efeitos biológicos resultam do sinergismo de todos os componentes do OE ou da atuação dos mais abundantes na sua composição (BAKKALI *et al.*, 2008; FRANZIOS *et al.*, 1997; KALEMBA *et al.*, 2003; SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

Na literatura, em muitos casos, os constituintes majoritários da composição do óleo essencial são estudados isoladamente para analisar as características biológicas e biofísicas. No entanto, a ação do OE, em comparação à atuação de alguns de seus compostos isolados, merece atenção pois, é provável que as atividades dos compostos isoladamente estudados sejam complementadas com a atuação dos compostos moleculares em menores proporções que formam o OE (BAKKALI *et al.*, 2008; FRANZIOS *et al.*, 1997; IPEK *et al.*, 2005; KALEMBA *et al.*, 2003; SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

A partir da relação entre as plantas medicinais e a humanidade, verifica-se a utilização dos óleos essenciais em ações médicas curativas ou preventivas e, a canela faz parte deste estudo como uma das plantas utilizadas na medicina. Por isso, interessante, neste ponto, apresentar a caracterização teórica inicial do óleo essencial da *Cinnamomum*.

2.3.2 ÓLEO ESSENCIAL DA *CINNAMOMUM HATSCHBACHII* VATTIMO-GIL (OECHVG)

Comprovando várias bioatividades da canela, outras pesquisas já identificaram aplicações larvicidas, bactericidas, carrapaticida e fungicidas, indicando ainda possibilidades de uso em fórmulas de remédios e fitoterápicos para tratamento tópico e terapêutico do gênero *Cinnamomum* (BAKKALI *et al.*, 2008; DUARTE, 2014; KOKETSU *et al.*, 1997).

De acordo com a literatura, a composição química dos óleos essenciais da *Cinnamomum* em geral possuem os grupos funcionais: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos e ésteres como é o caso de compostos como eugenol, b-cariofileno, cinamaldeído, *p*-isopropil-tolueno, α -pineno, benzaldeído, benzoato de benzila e linalol, em diferentes concentrações (DIAS, 2009; MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013; RANASINGHE *et al.*, 2002; REIS, 2012; SIMÕES *et al.*, 2010).

Como já mencionado, os diversos órgãos da planta podem acumular sua essência e, em uma mesma planta seu OE pode estar presente em todas as suas partes. Apesar disso, a composição do óleo apresenta variações a depender da localização na planta. No estudo feito por Oliveira (2000) sobre a Canela, o óleo encontrado na casca da árvore, possui alta concentração de cinamaldeído, já o óleo das folhas e das raízes possuem maior concentração de eugenol.

Já o estudo de Koketsu (1997) verificou que a composição do óleo essencial da casca da *Cinnamomum* apresenta 55% de cinamaldeído e 12% de eugenol. Já nas folhas tem-se 94% de eugenol e apenas traços de cinamaldeído.

Ainda, segundo Andrade (2012) na casca seca da *Cinnamomum zeylanicum* foram identificados mais de dez componentes, com maior concentração de (E)-cinamaldeído com 72 %, acetato de (E)-cinamila em segundo lugar, com 5,99 % e monoterpenoide 1,8-cineol em terceiro lugar, com 4,66 %.

Podemos citar a espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn que foi avaliada em relação à fitodisponibilidade de metais, à atividade antioxidante e antibacteriana do OE extraído das suas folhas e demonstrou resultados positivos para uma disponibilidade dos metais Ni e Cu, potencial antioxidante e atividade frente às bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (DIAS, 2009).

Além disso, o OE da *Cinnamomum zeylanicum* Blume obteve uma forte atividade antimicrobiana do contra 21 (vinte e um) tipos de bactérias, usando o método de difusão em disco (UNLU *et al.*, 2010). Ainda, segundo Mendes (2011), o OE da *Cinnamomum zeylanicum*

Breyn, extraído das folhas teve análise positiva em relação ao efeito larvicida contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti*. Já o estudo de Bona (2012), utilizou o OE da mesma espécie de Canela, para produção de um composto vegetal, juntamente com óleo essencial de orégano, alecrim e extrato de pimenta vermelha para redução de enterites específicas em aves causadas por *Eimeria maxima* e *E. tenella*. Observou-se também, no trabalho de Monteiro (2013) com o OE *Cinnmomum zeylanicum*, resultados positivos da atividade larvicida contra larvas e fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino). Também em Budri (2014), foi testado o OE da Canela na atividade sobre a formação de biofilmes em cepas de *Staphylococcus aureus*, em diferentes superfícies, reduzindo a capacidade de produção de biofilme.

2.4 NANOCIÊNCIA/NANOTECNOLOGIA/NANOBIOTECNOLOGIA (N&N&Nb)

A ciência, além de estudar e entender as diversas atividades do nosso cotidiano, possui desdobramentos que promovem conhecimento, desenvolvimento tecnológico com o intuito de melhorar o cotidiano da população e, pode-se dizer, que esta é a função da Nanociências, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia (DURAN *et al.*, 2006; DURANT *et al.*, 1978; POLETTO *et al.*, 2008; SOUZA, 2000).

O conjunto de conhecimentos obtidos ou produzidos com o objetivo de entender e orientar as pessoas em suas atividades cotidianas é o que chamamos de ciência. Já a aplicação de uma série de conhecimentos de forma prática, técnica e economicamente viável é o que se chama de tecnologia (DURAN *et al.*, 2006; HAWKING, 1988).

A evolução científica cresce a cada dia e com ela a esperança e possibilidade de transformação da sociedade, diante dos diversos problemas que enfrenta e assola sua população. Não é tarefa fácil, apesar de estarmos bastante evoluídos tecnologicamente, no Universo macroscópico, buscar respostas sobre, por exemplo, a existência de vida ou a condição dela a partir de como a conhecemos em outros planetas. Atualmente, estamos nos confins do nosso sistema solar, procurando analisar e compreender sobre o ambiente em condições tão inóspitas. Mas, o que dizer do desconhecido Universo imensamente pequeno!?

O termo “Nano” vem da palavra Grega que significa anão e se refere ao prefixo métrico 10^{-9} m. Isso significa um bilionésimo de um metro. "Nano" pode ser atribuído a qualquer unidade de medida.

A Nanociência, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia, empenham-se na caracterização, manipulação, fabricação, aplicação de sistemas biológicos e não biológicos e, como já mencionado, ainda possui um Universo a ser descoberto. Dentro destes conceitos, por exemplo,

podem até ser criados compostos moleculares inteligentes na escala nano, o que condiciona aos denominados nanocompósitos, com capacidades específicas e determinadas. Assim, nanocompósitos são formados por materiais híbridos, em que pelo menos um elemento possui dimensão nanométrica.

Por exemplo, compósitos e nanocompósitos, em escala não nano, possuem comportamentos diferentes, e a principal distinção reside no fato de que os nanocompósitos alcançam maior área superficial, o que gera maior interação do nanocomposto com o local de atuação (ASSIS *et al.*, 2012).

A nanotecnologia é mais utilizada, atualmente, nas áreas da biomedicina e tecnologia da informação, sendo novidade a sua utilização, também, na indústria de alimentos, onde já existem estudos em relação a nutrição e embalagens inteligentes (ASSIS *et al.*, 2012).

Aliado a essa evolução tecnológica está a utilização de produtos naturais, como por exemplo os óleos essenciais, vinculados a produção de sistemas emulsionados por serem economicamente viáveis, biodegradáveis e seguros, representam uma possibilidade de aplicação no controle de diversos microrganismos e patógenos que interfere na agroindústria, alimentação e seres humanos (DURAN *et al.*, 2006; JOAQUIN *et al.*, 2009).

2.5 SISTEMAS EMULSIONADOS

O termo emulsão deriva da palavra em latim *emulgeo*, que significa em português: mungir, que, por sua vez, quer dizer, extrair das tetas, ordenhar, explorar. Neste sentido, emulsões são preparações com aspecto leitoso (MORAIS, 2006).

Por meio de sistemas emulsionados são fabricados produtos com as mais diversas finalidades, em áreas cosméticas, farmacêuticas, industriais, alimentícias, agricultura, transporte de materiais de risco, detergentes, entre outros. No entanto, o sistema emulsionado não é totalmente novidade no nosso cotidiano, temos exemplos de sistemas naturais que consumimos há muito tempo, como o leite que ao olho desarmado parece uma solução homogênea, mas se utilizados equipamentos ópticos, pode-se observar estruturas em suspensão. O sangue também é emulsão natural, e dentre outros produtos emulsionados, cita-se a manteiga, maionese, margarina, cosméticos e cremes.

Sistema emulsionado, também chamado de emulsão, constitui-se pela mistura de dois elementos líquidos em fases diferentes, ou seja, imiscíveis, como por exemplo, água e óleo, onde um dos elementos está disperso no outro, classificando-se de acordo com a quantidade de cada elemento em: água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (FRANGE *et al.*, 2010; LIMA

et al., 2008). O elemento apresentado na forma de gotas é chamado fase dispersa ou fase interna, já o líquido da outra fase, denomina-se fase contínua ou externa (HERNÁNDEZ, 2004).

No sistema A/O (água em óleo) o óleo é o elemento externo/contínuo/dispersante, em maior quantidade e a água é o elemento interno/descontínuo/disperso, já no sistema classificado em O/A (óleo em água) a distribuição dos elementos ocorre de forma oposta, com óleo em menor quantidade, disperso em gotas e a água é que está em maior quantidade como elemento dispersante.

As emulsões são misturas instáveis termodinamicamente, ou seja, os elementos líquidos que compõem a mistura, inicialmente, aparentemente homogêneos, podem se separar. A estabilização da mistura pode advir de forma natural, decorrentes de agentes físicos cinéticos, que fazem com que a quebra da estabilização ocorra de forma, tão lenta, que garante uma estabilidade ao sistema. A estabilização de um sistema emulsionado pode ocorrer, também, por meio da interação de um elemento físico atuante, denominado emulsionante ou surfactante (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Vários agentes físico-químicos influenciam na estabilização de um sistema emulsionado, como o pH, densidade, distribuição de composição e tamanho médio das gotas, daí advêm outras classificações para as emulsões (SALAGER *et al.*, 2006).

Os sistemas emulsionados são comumente classificados em: macroemulsão (emulsão), microemulsão e nanoemulsão. Os tamanhos das estruturas que compõem os sistemas emulsionados, bem como a aparência e a estabilidade, que variam de acordo com o referido tamanho, são os apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Dimensão das partículas, aparência e estabilidade por classificação do sistema emulsionado

Classificação	Dimensão da Partícula	Aparência	Estabilidade
Macroemulsão/Emulsão	1 – 100 µm	Branca/Leitosa	Instável
Microemulsão	0,01 – 0,14 µm	Transparente	Termodinamicamente estável
Nanoemulsão	20 – 200 nm	Transparente	Cineticamente estável

Fonte: Adaptado de (HERNÁNDEZ, 2004; MEZADRI, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2004)

2.5.1 NANOEMULSÃO

Nanoemulsão consiste em um tipo de sistema emulsionado com mistura líquida de duas fases acrescida de um emulsionante, observando-se que as partículas que compõem a fase

dispersa do sistema possuem tamanho em escala nano, daí a denominação nanoemulsão ser preferível. Caracteriza-se por ser ultrafina e transparente.

Considerando a alta fluidez e a dificuldade de alcançar a estabilidade, as nanoemulsões são sistemas frágeis por natureza. Qualquer instabilidade apresentada geralmente será visualizada facilmente (MEZADRI, 2010; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004).

As nanoemulsões apresentam várias vantagens que despertam o interesse para a indústria de cosméticos, dentre as quais: diminuição de instabilidade como sedimentação, cremeação e floculação, prevenção de efeitos de coalescência, maior eficiência de distribuição e facilidade de penetração de agentes bioativos na pele (MEZADRI, 2010).

As nanoemulsões não alcançam a estabilidade muito facilmente e nem espontaneamente. É necessário o emprego de energia, com a utilização de dispositivos mecânicos ou químicos, para que a nanoemulsão alcance a estabilidade. São então considerados sistemas termodinamicamente instáveis e cineticamente estáveis (ASSIS *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ, 2004; KENTISH *et al.*, 2008).

A obtenção de um sistema nanoemulsionado requer o potencial químico dos componentes e o emprego de energia. Uma alta energia mecânica é utilizada a fim de produzir forças que causam o cisalhamento das partículas da fase dispersa, garantindo uma diferença de pressão interna e externa da gota (Lei de Young-Laplace), mantendo o equilíbrio necessário para formar partículas menores. A homogeneização da solução é feita com o equipamento gerador de ultrassom (ABBAS *et al.*, 2013).

Todo sistema possui a tendência natural de diminuir sua energia potencial desequilibrando-se, a manutenção do equilíbrio requer, então, uma diferença de pressão que aja contra a diminuição da tensão superficial da bolha. Concluindo-se que quanto menor a bolha, maior deve ser a diferença de pressão entre os lados interno e externo da mesma (HELLMUTH, 2006).

Os conhecimentos a respeito da inter-relação de materiais nanoestruturados com os diferentes receptores ambientais, também devem ser levados em consideração por meio da investigação nanotecnológica dos possíveis efeitos tóxicos que envolvem a produção, comercialização e descarte desses produtos (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

A produção de materiais diferenciados baseados em sistema dispersos com poder de estabilidade e aspecto sensorial agradável, está levando a nanotecnologia a desenvolver aplicações em embalagens de produtos desde o *desing*, confecção, descarte/reciclagem, que supre a exigência de mercado e do consumidor. Trabalhos com materiais nanoestruturados a partir de sistemas nanoemulsionados já foram produzidos inclusive com o OE *Cinnamomum*

incorporadas a matrizes poliméricas, com o objetivo de criar embalagens “ativas” (MOURA *et al.*, 2014).

No que se refere às aplicações da nanotecnologia em alimentos, destaca-se o uso de nanopartículas lipídicas sólidas utilizadas como transportadoras de colóides empregados para encapsular, proteger e entregar componentes funcionais como lipídios bioativos e drogas; nanocompósitos em alimentos e embalagens ativas (ASSIS *et al.*, 2012).

Quanto à possibilidade de aplicação em benefícios para os seres humanos, de acordo com Costa (2015) o sistema nanoemulsionado da *Lantana camara* Linn apresentou resultados inibitórios do crescimento do patógeno *Leishmania amazonensis* na forma promastigota. E segundo Ferreira (2014), sistemas nanoestruturados empregados como larvicida pode apresentar melhores resultados contra o *Aedes aegypti*.

Com o crescente aumento na produção de nanomateriais é necessário ampliar os estudos quanto a sua ecotoxicidade visando proteger diferentes ambientes de forma adequada e sustentável para a fauna, flora e a saúde humana e explorar atividades biológicas destes.

2.6 MICROBIOLOGIA: BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

A microbiologia consiste no estudo biológico de organismos microscópicos, dentre os quais encontram-se as bactérias, que são microrganismos simples, unicelulares. As bactérias são seres que se desenvolvem em variados tipos de meio (ar, água, solo, mar e até em outros seres vivos) e possuem grande importância para a vida humana, pois são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, podem provocar doenças e podem ser utilizadas em processos industriais em Engenharia Genética e em Biotecnologia (TORTORA *et al.*, 2012; TRABULSI *et al.*, 2008).

As bactérias que causam doenças são as patogênicas, e estas são foco de muitos estudos, tendo em vista a necessidade de se encontrar substâncias que inibam seu desenvolvimento ou proliferação, possibilitando controle sobre as mesmas e redução das patologias por elas causadas (TORTORA *et al.*, 2012; TRABULSI *et al.*, 2008). Assim, analisar a atividade antibacteriana de determinados princípios ativos, consiste em observar se a substância terá alguma ação contra o desenvolvimento dos microrganismos testados (TORTORA *et al.*, 2012; TRABULSI *et al.*, 2008).

Dentre os exemplos de bactérias patogênicas, de origem alimentar ou hospitalar que causam doenças infecciosas, cita-se as seguintes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae*. Diversos trabalhos utilizando substâncias

de uso tradicional (OE e extratos de plantas) e nanotecnologia (sistemas emulsionados), estão sendo testados contra esses microrganismos, que cada vez mais estão criando resistência aos antibióticos e soluções sanitizantes (BERALDO *et al.*, 2013; BRASIL, 2009; OLIVEIRA, 2011).

Com relação à atividade antimicrobiana de estudos usando o OE da Canela e de outras especiarias, podemos citar o trabalho de Beraldo (2013) que utilizando o método de microdiluição, determinou a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais das plantas canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e comparou com a CIM de hipoclorito de sódio. Como resultado obtido os OEs de Canela e Cravo-da-Índia foram mais eficientes que o hipoclorito de sódio na inibição das bactérias estudadas.

Em seu estudo Trajano (2009) comparou a atividade antibacteriana entre OEs de especiarias como *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Coriandrum sativum* L., *Cuminum cyminum* L., *Mentha. piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L., *Pimpinella anisum* L., *Piper nigrum* L., *Rosmarinus offinalis* L. e *Zingiber offinalis* Rosc frente as bactérias patogênicas *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*. A realização dos ensaios antibacteriano foi por meio do método de difusão em meio sólido e para a avaliação do resultado considerou-se possuidor de atividade antibacteriana o OE que apresentou halos de inibição igual ou maior que 10 mm de diâmetro. Neste sentido, os resultados mostraram que os OEs das folhas da *C. zeylanicum* e do *E. caryophyllata* apresentaram eficiência na inibição de todas as cepas bacterianas estudadas.

Ainda, Freire (2011) utilizou os OEs *Origanum Majorana* L. (manjerona), *Illicium verum* Hook. f. (estrela de anis) e *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, observando o crescimento do halo de inibição do micélio por meio de comparação com o padrão do prato (sem óleo). Os resultados obtidos com os OEs de manjerona e canela causaram inibição sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, enquanto o óleo essencial da estrela de anis apresentou atividade apenas contra *E. coli* e contra os fungos estudados, os OEs de manjerona, estrela de anis e canela apresentaram efeito inibidor.

Assim, observa-se da análise dos resultados encontrados na literatura que o OE essencial da *Cinnamomum* apresenta potencial antibacteriano e antifúngico, superando até mesmo o hipoclorito de sódio (BERALDO *et al.*, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Nanociência, Nanotecnologia e Nanobiotecnologia (N&N&Nb) e Microbiologia que formam o Complexo BIONORTE e Laboratórios de Botânica e Ecologia Vegetal (LABEV) da Universidade Federal do Acre (UFAC) em parceria com os Laboratórios de Nanobiotecnologia, Biologia e Química da Universidade de Brasília (UnB).

A pesquisa foi realizada com base em material botânico, passando pelas seguintes fases: determinação do material de estudo, coleta, processamento e análise. A planta escolhida para estudo foi a *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil (Canela), que, após coletada e processada, foi analisada sob três aspectos: óleo essencial, emulsões e nanoemulsões.

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

No óleo essencial de *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil foram realizadas medidas experimentais de Densidade, Cor e Aparência, Potencial Hidrogeniônico (pH), Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis), Infravermelho com Transformada de Fourier (IR-FT), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com Transformada de Fourier de (RMN-TF), Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) e análise antibacteriana. Quanto aos Sistemas Emulsionados foram realizadas medidas experimentais de Potencial Zeta e de estabilidade por meio do teste de centrifugação, também foi realizada a análise antibacteriana.

Para a realização dos procedimentos, desde a coleta até a análise do óleo e sistemas emulsionados, foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: **i) Coleta:** escada, tesoura, terçado nº 128, lona e sacos de plásticos de 100 litros de cor preta; **ii) Processamento do Óleo Essencial e Sistemas Emulsionados:** estufa microprocessada, liquidificador, beques 50, 100 e 500 ml, filme de PVC transparente, funil, papel alumínio, destilador de água, hidrodestilador para óleos essenciais tipo Clevenger, pipeta volumétrica graduada, tubos de ensaios com rosca e tampa, centrífuga e sonicador ultrassônico; **iii) Análise:** peagâmetro; refratômetro; espectrômetros UV-Vis, IR-FT, RMN-TF; cromatógrafo CG-EM; e, também, a centrífuga e o *ZetaSizer* que passam a ser descritos abaixo.

Para a melhor descrição divide-se abaixo os materiais de acordo com as etapas percorridas entre a coleta, processamento do óleo essencial e sistema emulsionado e análise dos produtos obtidos.

3.1.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA COLETA

Foram empregados neste processo: no que diz respeito a alcançar partes altas do vegetal, uma escada; para o corte de galhos fortes foi necessário um terçado nº 128; para retirar o órgão objeto de estudo do vegetal (folhas) sem danificá-los, fez-se o uso de uma tesoura; e de bandeja plástica para a lavagem; por fim, sacos plásticos para acondicionamento e armazenagem.

3.1.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o processamento do material e obtenção do óleo essencial e de sistemas emulsionados foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: estufa microprocessada, liquidificador/triturador, beques 50, 100 e 500 ml, filme de PVC transparente, funil, papel alumínio, balança eletrônica, balança analítica de precisão, destilador de água, hidroddestilador para óleos essenciais tipo Clevenger, pipeta volumétrica graduada, tubos de ensaios com rosca e tampa, centrífuga e sonificador ultrassônico.

Para a leitura e tratamento dos resultados apresentados após o processamento do material pesquisado na espectroscopia UV-VIS e IV-TF, foi utilizado o programa OriginPro 8.0 da OriginLab Corporation destinado a elaborar os gráficos; na espectroscopia por RMN-TF foi utilizado o programa 2D NMR Processor da ACD Labs para interpretação das leituras realizadas pelo equipamento e edição dos gráficos; na Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) foi utilizado o programa OpenChrome 1.0 Community Edition (Aston) para identificação dos resultados; e, na análise estatística dos testes microbiológicos foi usado o programa Assistat 7.7 beta.

3.1.2.1 Estufa Microprocessada de Secagem

Estufa modelo Q317M da Quimis, com câmara interna em aço inoxidável, estrutura externa com chapa de aço revestida em epóxi eletrostático, controlador eletrônico microcontrolado de temperatura, indicação digital da temperatura programável com as funções

de *set point* auto sintonia, com duplo display, temperatura mínima 50 °C e máxima 200 °C, homogeneidade na câmara: $\pm 5^{\circ}\text{C}$ em um ponto.

3.1.2.2 Triturador

Liquidificador modelo Power 2i L-28 400 W da Mondial, 2 Velocidades + Pulsar, copo com 1,25 litros de capacidade útil, tampa com copo dosador.

3.1.2.3 Balança Eletrônica

Balança portátil, modelo 2000, série CS da Ohaus, com capacidade de 2000g, precisão de 1g e Display de cristal líquido (LCD).

3.1.2.4 Hidrodestilador tipo Clevenger

Dispositivo de hidrodestilação tipo Clevenger com modificações, composto de um balão de fundo redondo de 5.000 mL, manta aquecedora da Quimis e bebedouro transformado para refrigeração.

3.1.2.5 Centrífuga Microprocessada

Centrífuga modelo Q222TM para tubos da Quimis, com corpo em aço e pintura epóxi eletrostática. Capacidade máxima de 280 mL com densidade de até 1,2 Kg/dm³ possui indicação digital do RPM (rotações por minuto), tempo, tampa aberta, alarmes e seleção digital da velocidade e do tempo.

3.1.2.6 Destilador de Água

Aparelho tipo Pilsen, modelo Q341 da Quimis, com caldeira em aço inox e cúpula de vidro transparente.

3.1.2.7 Homogeneizador Ultrassônico

Sonicador ultrassônico Sonoplus HD 2070 da Bandelin, com amplitude constante independente de mudanças nas condições da amostra. Possui controle da irradiação ultrassom, desgaste da sonda, limites de pulsação temperatura durante o processamento da amostra.

3.1.2.8 Balança Analítica de Precisão

Balança Série AY 220 digital da Shimadzu, com capacidade de 220g e precisão de 0,0001g. Possui calibração do teclado utilizando o peso externo.

3.2 MÉTODOS

Os métodos desenvolvidos durante a execução do trabalho iniciaram pela coleta do material botânico objeto de estudo, seleção e tratamento do mesmo, extração e caracterização do óleo essencial, até a produção e análise do sistema emulsionado.

3.2.1 ORIGEM E COLETA

As amostras das folhas da *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil foram coletadas nos meses de fevereiro e março de 2015 na chácara Viveiro da Amazônia localizada na Rua Belo Jardim, n. 187, loteamento Joafra, no município de Rio Branco, Estado do Acre nas seguintes coordenadas: -9.942481S, -67.853376W (Figura 3).

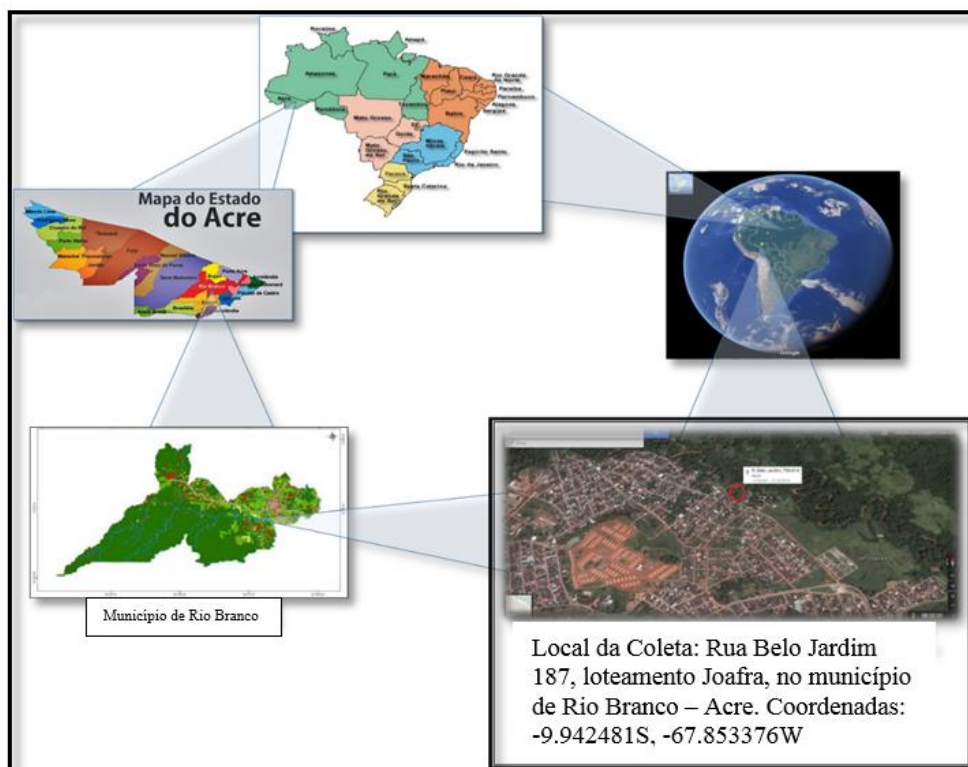


Figura 3 – Localização de extração do material botânico.

Fonte: C. A. L. Souza.

As amostras foram levadas para o Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal (LABEV) do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN) da Universidade Federal do Acre (UFAC) para identificação botânica e para o Laboratório N&N&Nb para processamento, no Complexo BIONORTE da UFAC.

3.2.1.1 Identificação Botânica

O material vegetal objeto desta pesquisa foi coletado em 5 (cinco) amostras contendo folhas, flores e frutos (Figura 4).



Figura 4 – Folhas, fruto e amostras de folhas da *Cinnamomum hatschbachii*.
 Legenda: **(a)** Folhas; **(b)** Fruto; e **(c)** Amostra proporcional das folhas.
 Foto: C. A. L. Souza

Após a limpeza das folhas e retirada do excesso de ramos secundários, o material foi acomodado em prensas de madeira e colocado em estufa de secagem composta de duas lâmpadas de 150 W durante 72 (setenta e duas) horas.

3.2.2 SELEÇÃO E TRATAMENTO DAS FOLHAS DA *CINNAMOMUM HATSCHBACHII* VATTIMO-GIL

Após a coleta e identificação botânica as folhas jovens e adultas sem defeito foram selecionadas para obtenção do óleo e sistemas emulsionados (Figura 5).



Figura 5 – Seleção de folhas da *Cinnamomum hatschbachii*.
Foto: C. A. L. Souza

Em seguida, o material foi lavado no Lboratório de N&N&Nb no Complexo BIONORTE na UFAC, em água corrente. E, com a finalidade de retirar o excesso de água das amostras, as mesmas foram espalhadas sobre uma lona, em ambiente externo, por um período de 1 (uma) hora (Figura 6). Ao final, foram recolhidas e colocadas em sacos plásticos escuros de 100 litros.



Figura 6 – Lavagem e secagem das folhas
Legenda: (a) Lavagem das folhas na cuba funda (b) Retirada do excesso de umidade das folhas da *Cinnamomum hatschbachii*.

Fotos: C. L. A. Souza.

Após as primeiras 24 (vinte e quatro) horas, as folhas foram submetidas a uma estufa microprocessada de secagem. A temperatura de graduação da estufa durante o processo foi de 50 °C, pelo período de 4 (quatro) a 5 (cinco) horas (Figura 7).



Figura 7 – Secagem das folhas da *Cinnamomum hatschbachii*.
Foto: C. A. L. Souza

Concluída a secagem na estufa microprocessada, conforme as folhas secas iam sendo retiradas do equipamento, imediatamente realizava-se o processo de trituração (Figura 8).



Figura 8 – Trituração das folhas da *Cinnamomum hatschbachii*.
Legenda: (a) Inserção das folhas no equipamento; (b) Trituração das folhas.
Fotos: C. A. L. Souza.

O material triturado foi armazenado em beques de 500 ml cuja abertura foi vedada por meio de cobertura com filme de PVC transparente, para evitar a absorção de umidade do ambiente.

3.2.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *CINNAMOMUM HATSCHBACHII* VATTIMO-GIL (OECHVG)

Para a extração do óleo essencial da Canela as folhas trituradas foram processadas por meio de um hidrodestilador tipo Clevenger com modificações.

Uma porção de 300 g de folha triturada pesada numa balança eletrônica portátil, foi utilizada em cada extração com a adição de 2,5 (dois e meio) litros de água destilada, produzida por um destilador de água tipo Pilsen.

O material triturado foi depositado dentro de um balão de fundo redondo por meio de um funil de bico médio (Figura 9).



Figura 9 – Processamento das folhas da canela trituradas para extração do OECHVG

Legenda: **(a)** Hidrodestilador Clevenger modificado; **(b)** Pesagem do material para introdução no balão de fundo redondo; e **(c)** Destilador de água tipo Pilsen.

Fotos: C. A. L. Souza.

O material vegetal ficou completamente submerso na água destilada.

Após a mistura dos componentes no balão, o mesmo foi encaixado em uma manta térmica que faz parte do equipamento, tendo sido ligado e monitorado à temperaturas entre 80 e 100 °C.

Quinze minutos após o sistema térmico ser ligado, conectou-se o tubo de vidro do hidrodestilador no balão de fundo redondo e acionou-se o sistema de refrigeração.

Iniciado o processo de hidrodestilação, o material botânico ferveu junto com a água e de acordo com o método de extração por hidrodestilação, a água vaporizou e o vapor levou consigo o óleo essencial. Ao chegar no condensador, os vapores sofreram choque térmico tornando-se líquidos, e formou-se dois sistemas visivelmente imiscíveis, água e óleo.

Dessa forma, o óleo essencial pôde ser coletado abrindo a válvula abaixo do condensador e foi acondicionado em tubos de ensaio com tampa e rosca, e recoberto com papel alumínio (Figura 10).

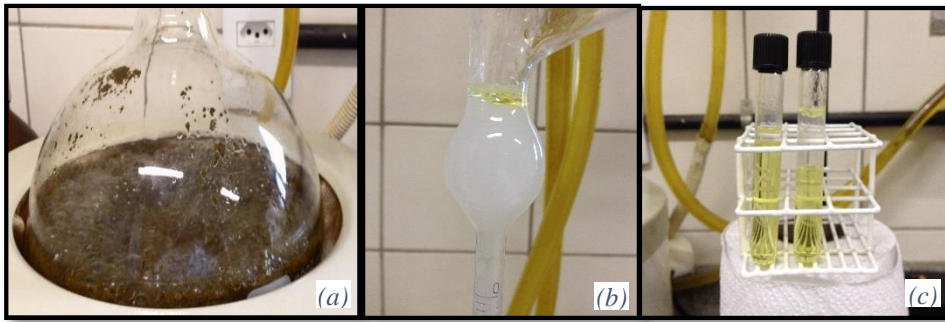


Figura 10 – Processo de extração do OECHVG.

Legenda: *(a)* Material botânico fervendo no Hidrodestilador; *(b)* Os dois sistemas distintos visíveis obtidos no condensador; e *(c)* OECHVG coletado nos tubos de ensaio.

Fotos: C. A. L. Souza.

O processo de uma extração, nas condições citadas, durou em média de 4 a 5 horas no hidrodestilador.

O óleo essencial coletado no procedimento de extração acima descrito, por meio do condensador, ainda passou por um processo de centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, com a finalidade de separar, em suspensão, o resíduo de água que ainda exista no óleo essencial coletado (Figura 11).



Figura 11 – Centrifugação.

Legenda: *(a)* Alocação dos tubos de ensaio com o material na centrífuga; *(b)* Processo de centrifugação.

Fotos: C. A. L. Souza.

No processo de centrifugação o resíduo de água fica em suspensão formando, novamente, dois sistemas distintos visíveis e a água foi retirada por uma pipeta volumétrica graduada.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DO OECHVG

Para a caracterização do OE da Canela realizou-se o cálculo do seu rendimento, medida do índice de refração, determinação do pH, cálculo da densidade, verificação da cor e aparência, espectroscopia no UV-Vis, IV-TF, RMN-TF e cromatografia CG-EM.

3.2.4.1 Determinação do Rendimento do OECHVG

O óleo essencial extraído de material vegetal pode ter seu rendimento calculado por meio de dois métodos diferentes, um que utiliza como base a biomassa seca (base livre de umidade – BLU) e outro que tem como base a matéria úmida (base úmida – BU) (SANTOS *et al.*, 2004). Segundo o mesmo autor, o método BU apresenta resultados imprecisos, preferindo-se, portanto, a utilização do método de cálculo do rendimento BLU, cujas repetições não resultam em desvios significativos.

Assim, para se conhecer o teor de umidade da biomassa, pelo método BLU, utilizou-se a seguinte equação (1):

$$TO = \frac{Vo}{Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100}\right)} \times 100 \quad (1)$$

onde,

TO = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração em (%).

Vo = volume de óleo extraído (ml).

Bm = biomassa aérea vegetal (folhas e ramos finos) em gramas.

$\left(\frac{Bm \times U}{100}\right)$ = quantidade de umidade presente na biomassa.

$Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100}\right)$ = quantidade de biomassa seca livre de umidade.

100 = fator de conversão para porcentagem.

O resultado obtido pela aplicação da Equação (1) foi expresso em porcentagem, e corresponde ao volume/massa, ou seja, quantidade de óleo essencial em mL por 100 g de biomassa seca, e expressa o teor de óleo contido na biomassa seca (ATOCHE, 2014; COSTA, 2015; FARIA, 2010; MOREIRA, 2015; SANTOS *et al.*, 2004).

3.2.4.2 Determinação do Índice de Refração do OECHVG

A determinação do índice de refração foi realizada no Laboratório de Química da UFAC, em triplicata.

Utilizou-se um Refratômetro Modelo WYA-2S da Nova com gabinete metálico, ajuste de dioptria, campo de focalização de leitura (digital) BRIX, com faixa de 0 - 95% e precisão 0,1%, índice de refração com faixa de 1.3000 – 1.7000 nD e precisão ± 0.0002 nD com leitura direta.

Para medir o índice de refração calibrou-se o refratômetro (Figura 12) com água destilada, de acordo com o padrão estabelecido pelo fabricante. Em seguida, inseriu-se duas gotas do óleo essencial da canela sobre o prisma, abaixando-se o braço de leitura que contém a lente e a fonte de luz de sódio e, iniciou-se a leitura obtendo o índice de refração absoluta do óleo essencial da Canela.



Figura 12 – Refratômetro de bancada.
Foto: C. A. L. Souza.

3.2.4.3 Determinação do potencial Hidrogeniônico (pH) do OECHVG

A medida do pH do óleo essencial foi obtido através do aparelho peagâmetro microprocessado de bancada pertencente ao Complexo BIONORTE da UFAC. A referida medida foi realizada em triplicata (Figura 13).

Utilizou-se o equipamento modelo Q400MT digital da Quimis, com corpo de plástico resistente, faixa de medição de - 2,001 pH a 20,000 pH, indicação da temperatura entre 0°C e 100°C com precisão de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Inicialmente o instrumento foi calibrado utilizando-se soluções padrões recomendadas pelo fabricante. Em seguida, inseriu-se o eletrodo no interior de um recipiente contendo o OE e determinou-se o pH.

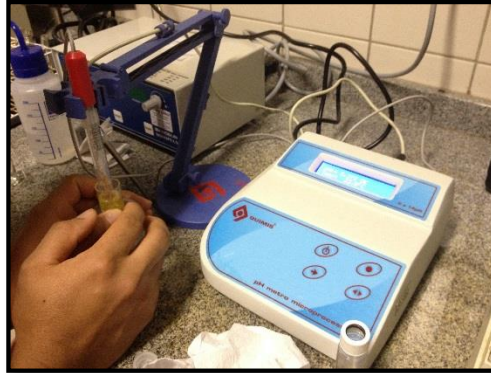


Figura 13 – Determinação do índice de pH do OECHVG
Foto: C. A. L. Souza.

3.2.4.4 Determinação da Densidade do OECHVG

A densidade do OECHVG objeto deste estudo foi determinada por meio de um picnômetro pertencente ao Laboratório de Química da UFAC, previamente seco, tarado, aferido e calibrado com água destilada, pelo método de deslocamento de fluidos. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente de 25°C e os dados foram coletados em triplicata (MENDES, 2011).

Utilizou-se dispositivo constituído de vidro de potencial precisão e ideal para se determinar a densidade de líquidos.

Para cálculo da densidade empregou-se a Equação (2) (MONTEIRO, 2013):

$$Densidade \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{M_1 - M}{5mL} \quad (2)$$

Onde:

M_1 - massa do picnômetro contendo o OE.

M - massa do picnômetro vazio.

5 mL volume do picnômetro.

3.2.4.5 Determinação da Cor e Aparência do OECHVG

Cor e aparência são propriedades físicas que podem ser avaliadas de forma visual e comparativa. Para análise da cor, as formulações foram dispostas em tubos plásticos transparentes, em uma superfície de fundo branco e a cor foi comparada com uma paleta de cores conhecidas sobre a influência de iluminação com luz branca (policromática) (MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013).

E, para a análise da aparência do OECHVG as amostras foram colocadas em tubos de ensaio de vidro transparente, dispostas em estante em grade de metal, tendo sido realizada, também, por meio de verificação visual, especificamente quanto à passagem da luz através do óleo (MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013).

3.2.4.6 Espectroscopia por Ultravioleta Visível (UV-Vis) do OECHVG

Utilizou-se um equipamento LAMBDA 950 da marca Perkin Elmer, com comprimentos de onda de 175 nm até 3.300 nm e medições de alta precisão do Laboratório do N&N&Nb do Complexo BIONORTE - UFAC.

A amostra do OECHVG foi preparada utilizando como solvente o Hexano nas concentrações de 0,10 %, 0,033 %, 0,011 %, 0,0037 % e 0,0012 % de óleo/solvente, tais concentrações foram necessárias para se obter linearidade nas leituras do equipamento.

O aparelho foi calibrado na faixa espectral de 190 a 800 nm por meio da realização de uma leitura padrão inicial, sem amostra, e outra leitura só com o solvente. Após, introduziu-se o solvente (padrão) em uma das cubetas e alocou-se no equipamento, em seguida, fez-se o mesmo procedimento para a alocação da amostra do OECHVG no equipamento (Figura 14). Foram realizadas tantas leituras quanto a quantidade de amostras dissolvidas obtidas nas diluições.



Figura 14 – Espectrômetro UV-Vis.

Legenda: **(a)** Recebendo as amostras nos poços de leitura; **(b)** Realizando a leitura;

Fotos: C. A. L. Souza.

Foram realizadas varreduras no espectrômetro em intervalos de 10 nm referente às faixas de comprimentos de onda entre 190 a 800 nm.

3.2.4.7 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) do OECHVG

A análise espectroscópica por IV-TF foi realizada no Complexo BIONORTE da UFAC.

Utilizou-se o equipamento Frontier FT-NIR/MIR Espectrômetros da marca PerkinElmer, adaptável de sistemas Frontier™ IR, que se adapta aos sistemas MIR e NIR, ou seja, com performance dual gama média-IR e próximo-IR único.

Para obtenção dos espectros IV-TF do OECHVG, uma gota da amostra (OECHVG puro) foi introduzida na cavidade do equipamento onde se encontra o prisma de cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe), conforme Figura 15.

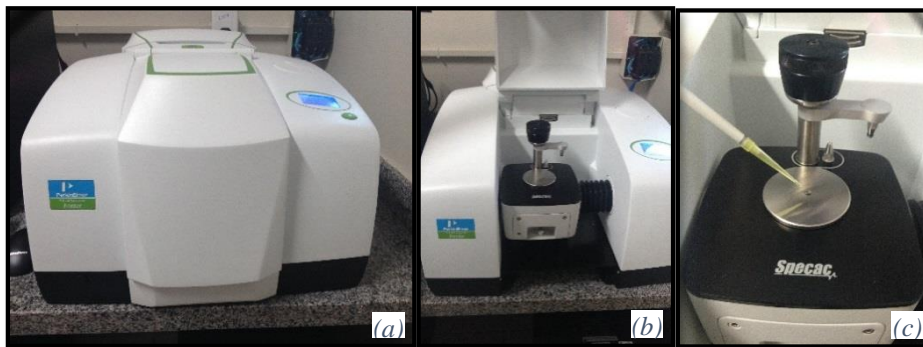


Figura 15 – Espectroscopia IV-TF do OECHVG

Legenda: (a) Espectrômetro fechado; (b) Fonte de leitura do espectrômetro; (c) Introdução do OECHVG na fonte de leitura.

Fotos: C. A. L. Souza.

O espectrômetro estava no modo de transmissão ATR e a medição foi realizada operando na faixa do espectro de luz infravermelho médio entre 4000 cm^{-1} e 100 cm^{-1} .

3.2.4.8 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com Transformada de Fourier (^1H -RMN-TF) do OECHVG

A análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear de hidrogênio com transformada de Fourier (^1H -RMN-TF) foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB).

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear serve para analisar a estrutura, interação cinética ou dinâmica das moléculas de compostos biológicos ou sintéticos.

Utilizou-se um espectrômetro por Ressonância Magnética Nuclear com Transformada de Fourier (RMN-TF) modelo Ascend 600, da marca Bruker (EUA), equipado com sonda de 5 mm.

O espectrômetro RMN foi operado, no modo de medição para detecção de grupos funcionais a partir do número de hidrogênios. O procedimento foi realizado por meio de uma sonda de 5 mm, a 600 MHz de frequência e a uma temperatura de 25 °C, tendo como solvente Clorofórmio Deuterado (CDCl_3) e Tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.2.4.9 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM) do OECHVG

O OECHVG teve sua composição química analisada por meio da técnica da cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas que foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB) (Figura 16).



Figura 16 – Cromatógrafo CG-MS

Legenda: (a) Cromatógrafo (vista externa); (b) Coluna cromatográfica (vista interna).

Fotos: C. A. L. Souza.

O Cromatógrafo possui: fonte de gás de arraste; controlador de fluxo; câmara de injeção; coluna cromatográfica contida em um forno; detector; e sistema de aquisição de dados. É uma técnica experimental que permite obtenção de informações estruturais de uma molécula, medindo sua massa e descrevendo sua fórmula.

Utilizou-se um instrumento analítico que mede o conteúdo de vários componentes da amostra, modelo GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu, que possui faixa de massas estendida (1,5 a 1.024 m/z), energia de Ionização variável (10 a 200eV), duas bombas turbomoleculares

(Quadrupólo e fonte de Íons) e lentes de detectores que conferem ao sistema sensibilidade – 1pg para OFN (S/N >60 – modo Scan e m/z=272).

O procedimento foi realizado com a instalação de uma coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, HP-5MS, tendo como fase estacionária 5 % difenil, 95 % dimetil polisiloxano. Utilizou-se o gás hélio como arraste a fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

Porções de 0,3 µL das amostras foram injetadas no modo split, com razão de divisão 1:10, com fonte de ionização a 70 eV.

Operou-se o equipamento sob as seguintes condições: temperatura do injetor: 280°C, programação de temperatura do forno: 40 °C – 240 °C (40 °C.min⁻¹) – 240 °C – 300 °C (80 °C.min⁻¹, 7,5 min.) e linha de transferência 280 °C. Sendo que o detector de massas utilizado foi o do tipo quadrupolo linear com varredura de 0,5 seg.scan⁻¹.

Para a preparação das amostras foram utilizados dois solventes (Triclorometano ou Clorofórmio e Etanol) e um composto dos dois solventes (Clorofórmio + Etanol) aliados ao OE, nas seguintes proporções (Tabela 2): de 2% e 0,2% (Figura 17).

Tabela 2 – Concentrações e diluições do OECHVG no CG-EM.

Concentração	1 (mg.mL ⁻¹)	2 (mg.mL ⁻¹)	3 Padrão (mL)
OECHVG/Etanol	$\frac{2}{10} = 0,2$	$\frac{20}{10} = 2$	10
OECHVG/Clorofórmio	$\frac{2}{10} = 0,2$	$\frac{20}{10} = 2$	10
OECHVG/Clorofórmio +Etanol	$\frac{2}{10} = 0,2$	$\frac{20}{10} = 2$	10

Fonte: C. A. L. Souza



Figura 17 – Amostras preparadas para o CG-EM

Foto: C. A. L. Souza.

Após a leitura das soluções com os solventes no cromatógrafo, somente a amostra do OECHVG com Clorofórmio (apolar) a 2 % mostrou resultados consistentes para análise dos dados.

O tamanho dos picos obtidos correspondem à abundância de cada composto na amostra. Cada pico apresenta um espectro de massa com base no qual é possível indicar o composto químico, por comparação com espectros de massa existentes no banco de dados do software e no banco de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

3.2.5 PRODUÇÃO E ANÁLISE DE SISTEMAS EMULSIONADOS

Inicialmente obteve-se uma macroemulsão, a partir do OECHVG com a adição de agente emulsificante, determinado a partir da análise do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) da emulsão, e empregou-se o método da ultrassonicação de alta energia para se obter o sistema nanoemulsionado.

Após realizou-se a análise do teste de centrifugação e *ZetaSizer* (potencial *Zeta* e índice de polidispersividade) da nanoemulsão obtida, além do teste de atividade antibacteriana.

3.2.5.1 Produção de Sistema Nanoemulsionado

Os sistemas nanoemulsionados foram produzidos no Laboratório de Bioprospecção e Sínteses de Nanocompósitos da UFAC (Complexo BIONORTE).

Para obtenção de nanoemulsão dissolveu-se, inicialmente, o emulsificante na fase aquosa e após misturou-se o resultado na fase oleosa, sendo a solução obtida submetida à técnica de alta energia ou homogeneização de alta pressão por ultrassom, por meio do equipamento descrito na Seção 3.1.2.7.

Como fase aquosa utilizou-se água destilada, como fase oleosa o OECHVG, e como tensoativo foram usados Polissorbato 80 e Oleato de Sorbitano 80 com especificações apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos tensoativos utilizados nas formulações

Nome	INCI*	Nome Comercial	EHL**	Fabricante	Características
Polissorbato 80	Polyssorbate 80	Tween® 80	15,0	Polytechno	Hidrofílico Não Iônico
Oleato de Sorbitano 80	Sorbitan Monooleate	Span® 80	4,3	Sabão e Glicerina	Lipofílico Não iônico

Fonte: (COSTA, 2015)

*INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*

**EHL: Equilíbrio Hidrofílico/Lipofílico

No homogeneizador ultrassônico, a ponta de titânio foi introduzida em contato direto com a amostra e, devido ao aumento da temperatura, o sistema foi refrigerado com água e gelo. Todo o processo seguiu a seguinte configuração: 5 ciclos de processamento por um período de 5 minutos cada, à uma potência de 60 watts (Figura 18).

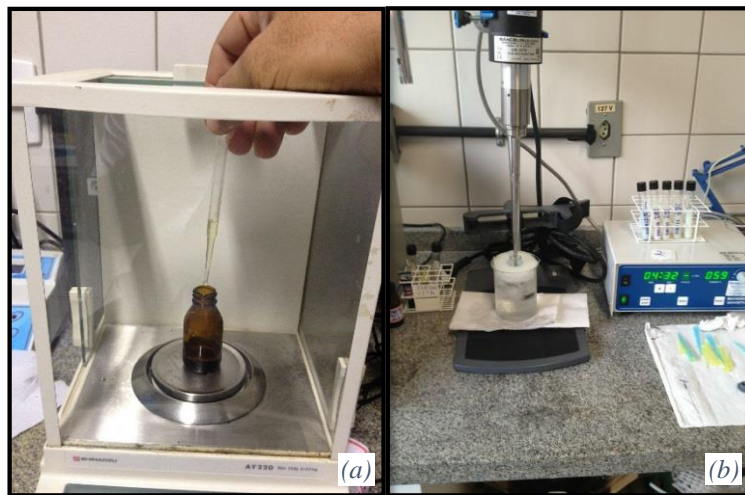


Figura 18 – Nanoemulsificação

Legenda: (a) Mistura do OECHVG com o agente emulsificante; (b) Ultrassonicação da solução.

Fotos: C. A. L. Souza.

3.2.5.1.1 Determinação do EHL do OECHVG

Para o estudo do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) do OECHVG, utilizou-se dois agentes emulsificantes (tensoativos), um hidrofílico, compatível com a água (Polyssorbate 80 - Tween® 80) e um lipofílico, compatível com o óleo (Sorbitan Monooleate - Span® 80).

O sistema de Equações (3) e (4) do método Griffin (1946) foi aplicado para o cálculo das quantidades necessárias de tensoativos em cada valor de EHL final da solução: (GRIFFIN, 1946).

$$\frac{M_A \cdot EHL_A + M_B \cdot EHL_B}{M_A + M_B} = EHL_{Final} \quad (3)$$

$$M_A + M_B = 10 \text{ g} \quad (4)$$

Onde:

M_A = Massa do Tensoativo Hidrofílico;

M_B = Massa do Tensoativo Lipofílico;

EHL_A = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

EHL_{Final} = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Final;

Na produção da nanoemulsão OECHVG/A, para 5 g de massa total aplicou-se a seguinte proporção: 85 % Água (A), 5 % Óleo (O) e 10 % Tensoativo (T). Teve-se, também, como base, as especificações (valor do EHL) de fábrica dos tensoativos: Span 80 = 4,3; e Tween 80 = 15.

Assim, a partir de uma escala de valores de 8,0 a 15,0 foi determinado o EHL requerido para o OECHVG (GRIFFIN, 1946).

A quantidade de cada tensoativo necessária para cada valor que compõe a escala de EHL Final para os sistemas emulsionados está descrita na (Tabela 4).

Tabela 4 – Massas dos tensoativos para formulações de diferentes EHL Final.

Formulação	EHL Final	EHL Tween 80	Massa (g) Tween (80)	EHL Span 80	Massa (g) Span 80	Massa Total (g)
F-1	8,0	15	3,46	4,3	6,54	10
F-2	9,0	15	4,39	4,3	5,61	10
F-3	10,0	15	5,33	4,3	4,67	10
F-4	11,0	15	6,26	4,3	3,74	10
F-5	12,0	15	7,20	4,3	2,80	10
F-6	13,0	15	8,13	4,3	1,87	10
F-7	14,0	15	9,07	4,3	0,93	10
F-8	15,0	15	10,0	4,3	0,00	10

Fonte: (COSTA, 2015)

Para formulação dos sistemas emulsionados utilizou-se as quantidades descritas na Tabela 5 dos componentes água/óleo/tensoativo para cada EHL Final da escala de 8,0 a 15,0 que foram nomeadas, respectivamente, de F1 – F8:

Tabela 5 – Composição das formulações para estudo do EHL Final – 10 % de tensoativos.

Água (%)	Massa da água (g)	Tensoativo (%)	Massa do tensoativo (g)	Óleo (%)	Massa do óleo (g)	Massa total (g)
85	4,25	10	0,5	5	0,25	5

Fonte: C. A. L. Souza

3.2.5.2 Análise de Sistema Emulsionado

Após a produção do sistema emulsionado houve necessidade de realização de determinadas análises para verificar as condições de estabilidade do sistema e se as partículas atingiram um nível tal de tamanho a ponto de caracterizar uma nanoemulsão. Assim, realizou-se a análise do teste de centrifugação e *ZetaSizer* do sistema emulsionado obtido.

Também foi realizada análise da atividade antibacteriana das nanoemulsões produzidas.

3.2.5.2.1 Teste de Centrifugação

Após 24 (vinte e quatro) horas do preparo das amostras com EHLs de 8,0 a 15,0, cada uma foi levada ao equipamento de centrifugação em tubos de ensaio com tampa e rosca contendo 8 mL, tendo sido testadas nos ciclos de rotação de 1000, 2500 e 3500 rpm, equivalendo a 164, 1041 e 2034 G, respectivamente.

As amostras foram submetidas ao processo de centrifugação durante 15 (quinze) minutos para cada ciclo. Em seguida, foram deixadas em repouso por um período de 24 horas a temperatura ambiente de 23 °C e foi realizada a avaliação visual.

As formulações que não apresentarem fenômenos de instabilidade (cremação, sedimentação ou separação de fases) assim como, dimensões menores que 200 nm, após o período de repouso serão consideradas estáveis.

3.2.5.2.2 *ZetaSizer*

Utilizou-se o equipamento *ZetaSizer* do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB, modelo Nano ZSP® da Malvern Instruments Ltd (Reino Unido, laser 633 nm), que possui as

seguintes especificações em relação ao tamanho de partículas e tamanho molecular na faixa de medição: 0,3 nm a 10,0 micra (diâmetro); Princípio de medição: Espalhamento de luz dinâmico; Volume mínimo da amostra: 12 µL; Precisão: Melhor que $\pm 2\%$ em padrões NIST. E, também, as seguintes características gerais: Faixa de controle da temperatura: 0°C - 90°C $\pm 0,1$; Fonte de luz: He-Ne laser 633 nm, Máx 10 mW.

O potencial *Zeta* (pZ) e o diâmetro hidrodinâmico (D_H) das amostras foram determinados por meio da técnica da dispersão dinâmica da luz e dispersão de luz eletroforética por efeito *doppler* com laser.

As formulações foram diluídas por meio do acréscimo de água ultrapura (milli-q) na proporção de 50 µL:950 µL (v:v), após, foi realizada a calibragem do equipamento por 120 (cento e vinte) segundos e a análise, em triplicata, da amostra a uma temperatura de 25 °C e ângulo de leitura do laser a 90°.

3.2.5.3 Teste de Atividade Antibacteriana

A análise da atividade antibacteriana das amostras do sistema emulsionado com EHL variando de 09 a 15, assim como do OECHVG foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Complexo BIONORTE da UFAC, por meio da técnica de difusão em disco (CLSI, 2003), utilizando as seguintes bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Durante o procedimento as bactérias foram crescidas em um período de 4 a 6 horas, a uma temperatura de 37 °C, sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2003).

Após, realizou-se a incubação onde as bactérias foram inoculadas em placas de Petri com meio ágar Muller-Hinton sobre as mesmas foram depositados discos de papel e sobre os discos colocou-se 20 µL das amostras, realizando-se a incubação a uma temperatura de 37 °C pelo período de 18 (dezoito) horas (CLSI, 2003).

Em cada resultado foi obtido o halo de inibição de três amostras, a média e o desvio padrão. Tais resultados foram comparados estatisticamente por meio do Teste de Tukey para comparar as médias entre os tratamentos contra as bactérias, a partir das amostras do OECHVG e as nanoemulsões.

Em cada disco de amostra considerar-se-á com atividade antimicrobiana o que apresentar a formação de um halo de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (TRAJANO *et al.*, 2009).

Por fim, foi realizada a medição dos halos (discos) de inibição formados, por meio de um paquímetro digital (CLSI, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos baseiam-se nas análises realizadas a partir da caracterização físico-química e espectroscópicas do OECHVG, produção de nanoemulsão do OECHVG e da análise da atividade antibacteriana do OECHVG e do sistema nanoemulsionado.

4.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

De acordo com a caracterização botânica, a espécie da árvore canela estudada, foi identificada como pertencente à família das Lauráceas, com o nome de *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil. Sua exsicata se encontra depositada no herbário da UFAC sob nº 6581.

4.2 RENDIMENTO DO OECHVG

O rendimento médio do OECHVG extraído pelo método de hidrodestilação foi calculado em 0,71 % (Tabela 6). O valor determinado nos mostra que para cada 100 gramas de folhas secas trituradas da *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil serão obtidos 0,71 ml do OE.

Tabela 6 – Rendimento do OECHVG

Nº de extrações	Massa por extração (g)	Massa total (g)	Volume total OE (mL)	Volume OE por extração (mL)	Rendimento (% ou mL.100g ⁻¹)
15	300	4.500	31,95	2,13	0,71

Fonte: C. A. L. Souza

O rendimento médio do OE da *Cinnamomum* obtido se aproxima de resultados encontrados na literatura científica entre 0,7 a 1,0 % (Tabela 7).

Tabela 7 – Rendimento do OE *Cinnamomum* descrito na literatura científica

Espécie	Rendimento (%)	Referência
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	0,43	(ANDRADE, 2010)
<i>Cinnamomum verum</i> Presl	0,70	(KOKETSU <i>et al.</i> , 1997)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	0,75	(MENDES, 2011)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	0,93	(UNLU <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	1,03	(MONTEIRO, 2013)

Fonte: C. A. L. Souza

Analisando a Tabela 7, observa-se que o método de cálculo do rendimento (BLU) do OE encontrados na literatura científica é o mesmo praticado nesta pesquisa e a variação entre os resultados obtidos de espécies pertencentes ao mesmo gênero (*Cinnamomum*) pode ser atribuída a fatores relacionados a local e época de coleta, clima da região, tipo de solo e umidade relativa do ar.

4.3 ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO OECHVG

O valor médio do índice de refração obtido, a partir da metodologia já descrita, para o OECHVG foi de 1,5769 a 27,6 °C. O referido valor está em conformidade com valores encontrados na literatura (DIAS, 2009; MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013; REIS, 2012).

No estudo físico-químico o índice de refração no OE é uma medida importante para a identificação da pureza, adulteração, alteração e do tamanho da cadeia de hidrocarbonetos, pois, quanto maior o índice de refração, maior será a cadeia e o seu grau de instauração (COSTA, 2015; DOURADO, 2012; LUTZ, 1985; MARTINS *et al.*, 2010; MENDES, 2011).

O valor obtido se aproxima do valor encontrado na literatura científica para a *Cinnamomum zeylanicum* de 1,6073 (GENDE *et al.*, 2008).

4.4 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) DO OECHVG

Na medida do pH do OECHVG foram obtidos os seguintes valores em três medidas, 1^a) 5,50; 2^a) 5,93; 3^a) 6,25, caracterizando um valor médio de 5,89, considerado ácido, porém não foram encontrados valores de referência na literatura científica acerca da *Cinnamomum*.

O valor do pH determinado para a pele humana é fator de motivação para as pesquisas, tendo em vista as possibilidades de utilização dos produtos em seres humanos por meio de aplicação tópica, sem prejuízos para superfície cutânea que apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), fator que caracteriza uma proteção contra bactérias e fungos (LEONARDI *et al.*, 2002; ZLOTOGORSKI, 1987).

Assim, o valor do pH identificado para o OECHVG (5,89), apesar de não ter sido encontrado outros dados na literatura científica para comparação, pode ser considerado compatível com o pH da pele, despertando o interesse da indústria cosmética e farmacêutica, já que pode ser útil na neutralização de substâncias agressivas como detergentes (LEONARDI *et al.*, 2002; RODRIGUES, 1995).

4.5 DENSIDADE DO OECHVG

A densidade do OECHVG foi medida em triplicata obtendo-se os seguintes valores sobre as mesmas condições: 1ª medida: 1,0206 g.mL⁻¹; 2ª medida: 1,0185 g.mL⁻¹; 3ª medida: 1,0301 g.mL⁻¹, caracterizando-se o valor médio de 1,0230 g.mL⁻¹, próximo dos valores encontrados na literatura científica (DIAS, 2009; MONTEIRO, 2013; REIS, 2012).

O valor obtido se aproxima do valor encontrado na literatura científica para a *Cinnamomum zeylanicum* de 1,061 g.mL⁻¹ (GENDE *et al.*, 2008). Referidos valores, em comparação com densidade da água (1,0 g.mL⁻¹ a 25 °C), identificam que o OECHVG é pouco mais denso (COSTA, 2015; DIAS, 2009; MONTEIRO, 2013).

A partir dessa comparação, pode-se prever que tipo de desestabilização poderá ocorrer com o sistema emulsionado produzido com adição do OECHVG, pois quando se utiliza óleos menos densos que a água deve-se observar a cremação e óleos menos densos devem provocar desestabilização do sistema emulsionado por sedimentação (COSTA, 2015).

Outro aspecto em que a identificação da densidade do OE pode ser útil se relaciona à pureza da substância, uma vez que havendo diferença de densidade pode-se constatar adulterações (DOURADO, 2012).

4.6 COR E APARÊNCIA DO OECHVG

A análise visual do OECHVG obteve o resultado de cor amarelada em comparação com uma paleta de cores conhecidas (Figura 19), em conformidade com dados existentes na literatura científica (MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013).

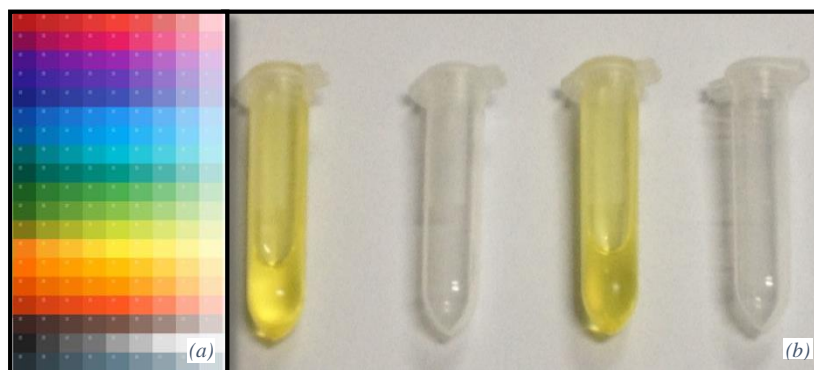


Figura 19 – Cor do OECHVG

Legenda: (a) Paleta de cores conhecidas; (b) OECHVG em tubos plásticos transparentes.

Foto: C. A. L. Souza.

O OECHVG, em relação à aparência, é considerado transparente, pois percebe-se, visualmente a passagem da luz através da amostra (Figura 20), no mesmo sentido também foi encontrado na literatura (MENDES, 2011; MONTEIRO, 2013).

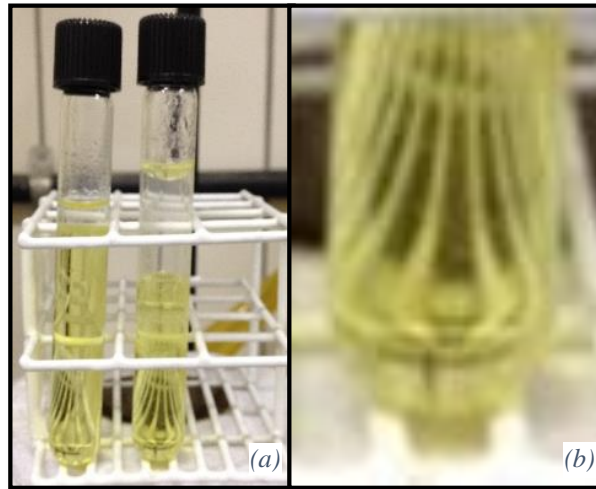


Figura 20 – Aparência do OECHVG

Legenda: (a) Amostras do OECHVG na estante; (b) Detalhe da amostra do OECHVG.

Fotos: C. A. L. Souza.

No que se refere à cor, os óleos essenciais aparentam incolores ou amarelados. E, em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis quando na presença de ar, luz, calor, umidade e outros fatores externos. As propriedades físico-químicas que auxiliam na identificação dos óleos essenciais e no seu controle de qualidade: índice de refração e atividade óptica (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

4.7 ANÁLISE DO ESPECTRO DO UV-VIS DO OECHVG

Ao submeter as amostras do OECHVG à Espectroscopia por Ultravioleta Visível (UV-Vis) foi obtido um espectro de UV-Vis com duas bandas de absorção: uma em 217 nm e outra em 278 nm (Gráfico 1).

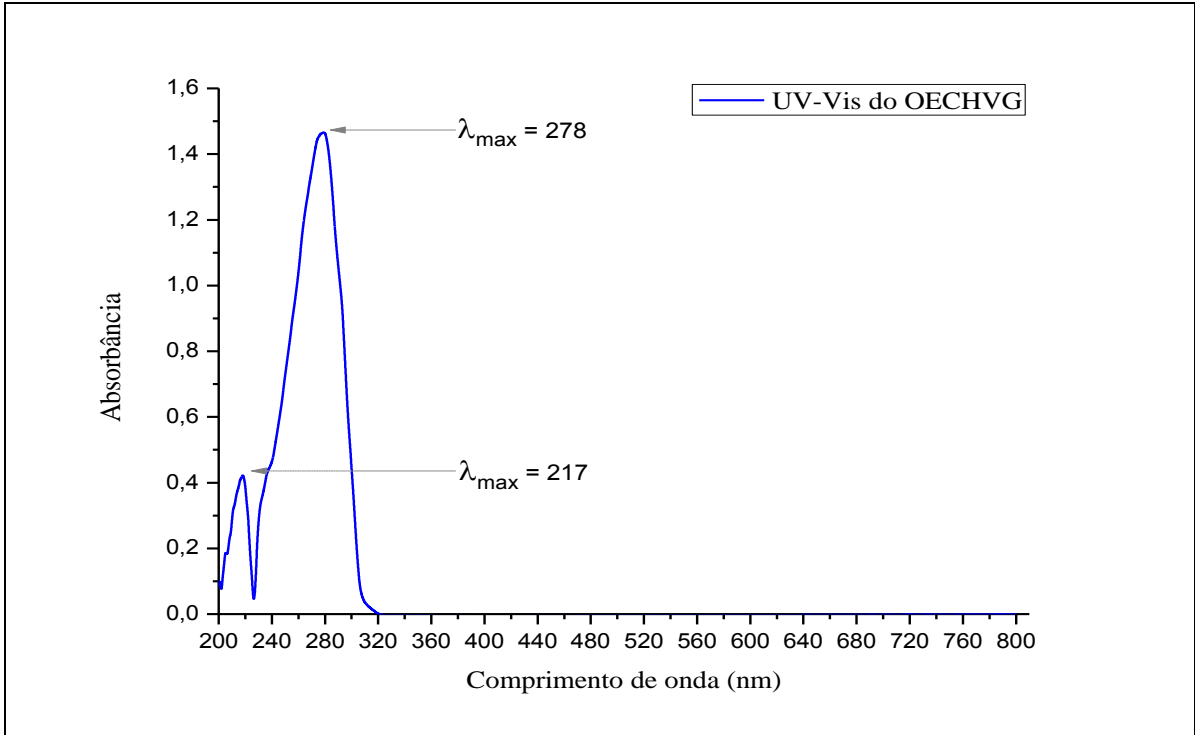


Gráfico 1 - Espectro UV-Vis do OECHVG

A banda de absorção de 217 nm pode estar associada a insaturações do tipo C=C. Em relação a banda de absorção de 278 nm pode estar associada a hidrocarbonetos com anéis aromáticos. As duas bandas de absorção configuram transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (MCMURRY, 2014; PRETSCH *et al.*, 2009).

A banda de absorção em 217 nm também foi identificada na análise por ultravioleta do óleo essencial de quatro espécies de *Protium* (oleorresinas) (SILVA, 2006).

Já em relação a canela, o extrato da *Cinnamomum verum* analisado no UV-Vis detectou em seu espectro absorção nas bandas de 232 nm e 270 nm que também podem indicar compostos hidrocarbonetos aromáticos monosubstituídos do benzeno com transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (SICHERI, 2013).

4.8 ANÁLISE DO ESPECTRO DO IV-TF DO OECHVG

Cada molécula possui uma quantidade de energia em sua estrutura traduzindo-se em uma constante vibração molecular. Quando a molécula absorve a radiação IV na faixa entre 10000 a 100 cm^{-1} , esta se transforma em energia de vibração molecular, processo denominado *quantização*, ou seja, a molécula pode ser deformada axialmente (vibração ao longo do eixo de

ligação de forma simétrica ou assimétrica) ou angularmente (vibração de um grupo de átomos em relação à molécula no plano ou fora do plano) (MCMURRY, 2014; SILVERSTEIN, 2013).

Neste sentido, considerando que cada grupo funcional possui uma combinação específica de ligações, cada um possuirá um grupo característico de absorção de energia no infravermelho. Assim, identificando-se quais frequências são absorvidas e quais não são, é possível determinar os grupos funcionais contidos na molécula (BRASIL, 2010; MCMURRY, 2014; SILVERSTEIN, 2013)..

O OECHVG submetido a Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) foi obtido um espectro com as principais faixas de maior absorção entre 2926 e 688 cm^{-1} (Gráfico 2).

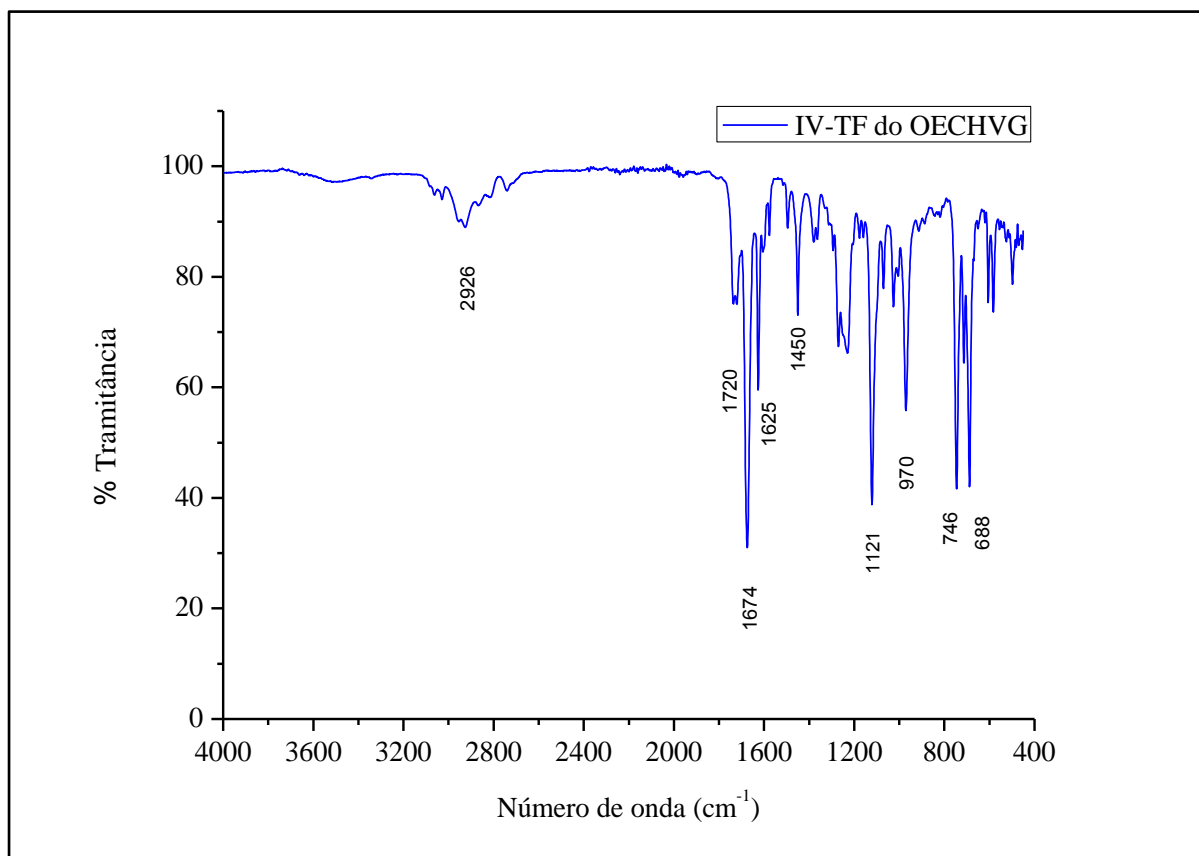


Gráfico 2 - Espectro IV-TF do OECHVG

Os valores de número de ondas obtidos correspondem aos modos vibracionais da molécula e grupos funcionais demonstrados na Tabela 8:

Tabela 8 – Posição e identificação das bandas observadas no IV-TF do OECHVG

Número de ondas (cm⁻¹)	Modo de vibracional	Grupo funcional
2926	Deformação axial assimétrica C–H	Alcano
1720	Deformação axial C=O	Carbonila/Aldeído
1674	Deformação axial C=C	Alquenos
1625	Deformação angular C–C	Hidrocarboneto Aromático
1450	Deformação angular C–H	Metila
1121	Deformação axial O–H, COO	Álcool/Éster
970	Deformação angular simétrica C=C	Alquenos
688 e 746	Deformação angular C ₆ –H ₆	Monossubstituídos de Hidrocarboneto Aromático

Fonte: (MCMURRY, 2014; PRETSCH *et al.*, 2009).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número de onda 2926 cm⁻¹ indica uma vibração de deformação axial assimétrica do grupo metileno (CH₂), derivado dos alcanos (C–H) que ocorrem na região de 3000 a 2840 cm⁻¹ para (SILVERSTEIN, 2013) e 2840 a 2960 cm⁻¹ para (MCMURRY, 2014).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número de onda 1720 cm⁻¹ indica uma vibração de deformação axial C=O do grupo carbonila de aldeído. Esses grupos funcionais mostram uma absorção intensa entre as bandas de 1740–1720 cm⁻¹ (PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número de onda 1674 cm⁻¹ indica um grupo funcional alquenos C=C. Esse grupo mostra uma absorção intensa entre as bandas 1690–1635 cm⁻¹, sofrendo uma vibração de deformação axial (PRETSCH *et al.*, 2009).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número de onda 1625 cm⁻¹ indica um grupo funcional hidrocarboneto aromático C₆H₆. Esse grupo mostra uma absorção de média a fraca intensidade entre as bandas 1625-1575 cm⁻¹, sofrendo uma vibração de deformação angular simétrica (PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número 1450 cm⁻¹ indica um grupo metila CH₃ (coincide com CH₂). Esse grupo mostra uma absorção de média intensidade entre as bandas de 1475–1450 cm⁻¹, sofrendo uma vibração de deformação angular assimétrica (PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número 1121 cm^{-1} indica possíveis grupos de álcool ou éster. Os espectros de bandas características dos álcool e éster derivam da vibração de deformação axial de O–H (hidroxila) e de COO ou C–O–C. O grupo ésteres alifáticos apresentam uma absorção de forte intensidade entre as bandas de $1125\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ e entre as bandas $1150\text{--}1080$ uma absorção característica do alquil-éter (LOPES *et al.*, 2004; PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

A absorção do espectro correspondente à faixa com número 970 cm^{-1} indica um grupo alcenos monosubstituídos C=C. Esse grupo apresenta uma absorção de forte intensidade entre as bandas de $980\text{--}965\text{ cm}^{-1}$, sofrendo uma vibração de deformação angular simétrica fora do plano C–H (LOPES *et al.*, 2004; PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

A absorção do espectro correspondente à faixa com números 688 e 746 cm^{-1} indicam um padrão de monosubstituídos de grupo hidrocarboneto aromático C₆–H₆. Esse grupo apresenta uma absorção de fraca a média intensidade entre as bandas de $900\text{--}675\text{ cm}^{-1}$, sofrendo uma vibração de deformação angular (120°) fora do plano C–H. (LOPES *et al.*, 2004; PRETSCH *et al.*, 2009; SILVERSTEIN, 2013).

Dessa forma os resultados obtidos pela análise do OECHVG no IV são compatíveis com análises já realizadas em outras espécies da *Cinnamomum* encontrados na literatura, das quais cita-se Gende (2008) que também indicou a presença de grupos de aldeídos aromáticos e monoterpenos no OE extraído das folhas e ramos da *Cinnamomum zeylanicum*; Phutdhawong (2007), que constatou a presença de uma banda de absorção ampla referente ao grupo hidroxila, no óleo essencial da *Cinnamomum iners* extraído a partir da casca e caule utilizando o método de extração assistida por microondas; e Kim (2004), que analisou o OE extraído das folhas da *Cinnamomum cassia* e identificou a presença do aldeído *trans*-cinâmico, cujo grupo também foi encontrado no OECHVG.

4.9 ANÁLISE DO ESPECTRO DE ¹H-RMN-TF DO OECHVG

O espectro objeto da leitura do OECHVG teve atividade à esquerda do zero, na faixa de deslocamento entre 0 e 10. Esta faixa é dividida em cinco principais regiões que caracterizam determinados grupos funcionais, sendo que o OECHVG apresentou resultados ativos nas regiões do hidrocarbonetos saturados, alifáticos, vinílicos e aromáticos (Gráfico 3). Isto significa que as ligações entre carbono e hidrogênio nas moléculas do OECHVG podem ser simples (saturadas), com o hidrogênio ligado a carbonos vizinhos aos carbonos da dupla ligação

(alílicas), com hidrogênio ligado diretamente ao carbono de dupla ligação (vinílicas) ou formando um anel benzênico (aromáticas) (PRETSCH *et al.*, 2009).

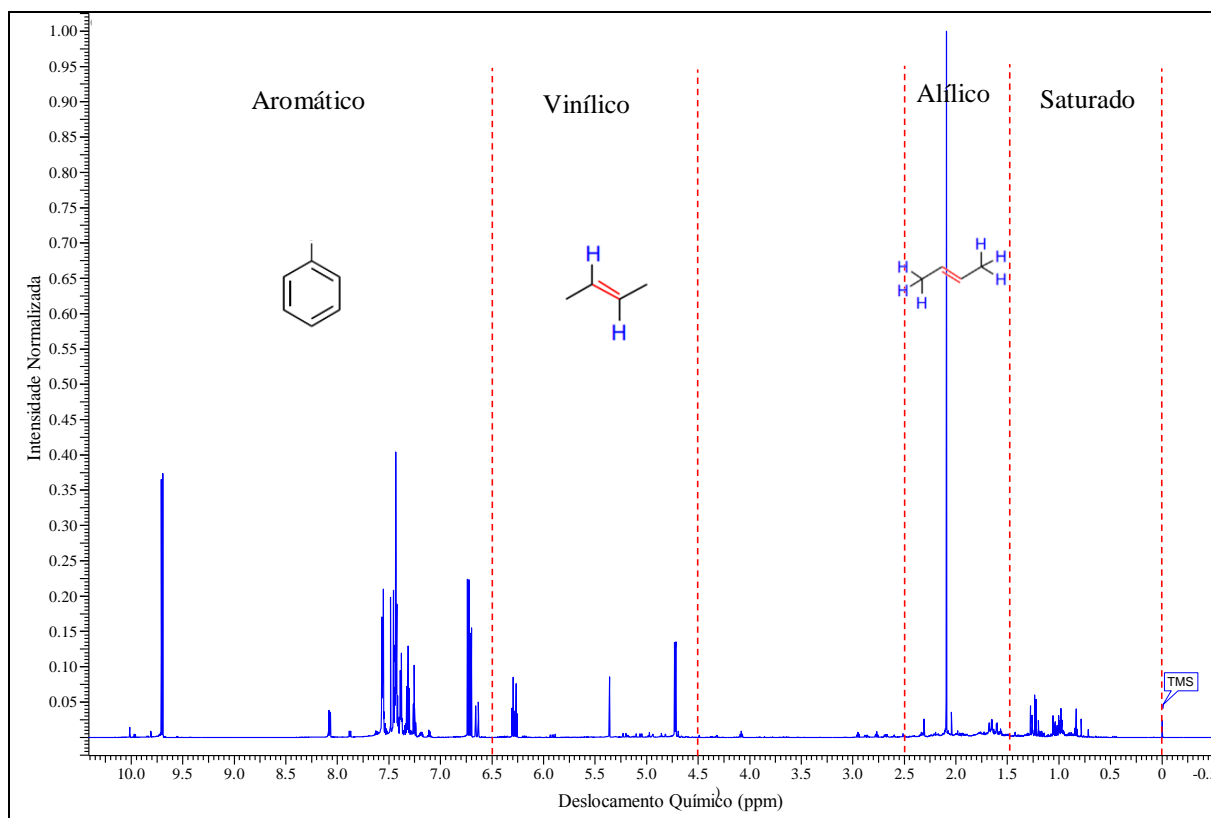


Gráfico 3 – Espectro RMN do OECHVG – grupos funcionais por regiões
Fonte: (MCMURRY, 2014).

O espectro de RMN-TF de ^1H apresenta vários picos de leitura, para a análise dos resultados e qualificação das estruturas funcionais nas cadeias carbônicas presentes no OECHVG. O espectro obtido do OECHVG apresentou 22 (vinte e dois) multipletos, dos quais observou-se, em detalhe, a existência de 3 (tres) dupletos (Gráficos 4 e 5), os quais identificam-se os possíveis grupos funcionais conforme se encontra na literatura (Tabela 9).

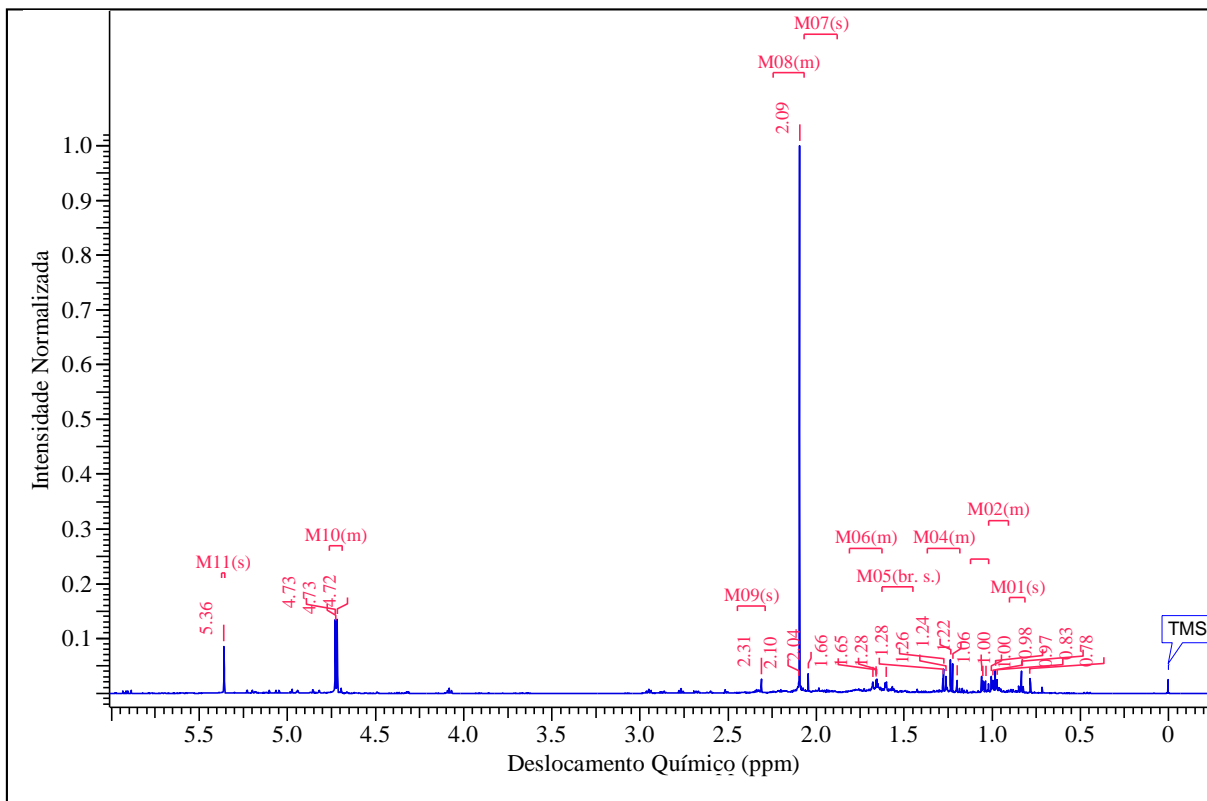


Gráfico 4 – Espectro RMN do OECHVG – multipletos de 0 a 6 ppm

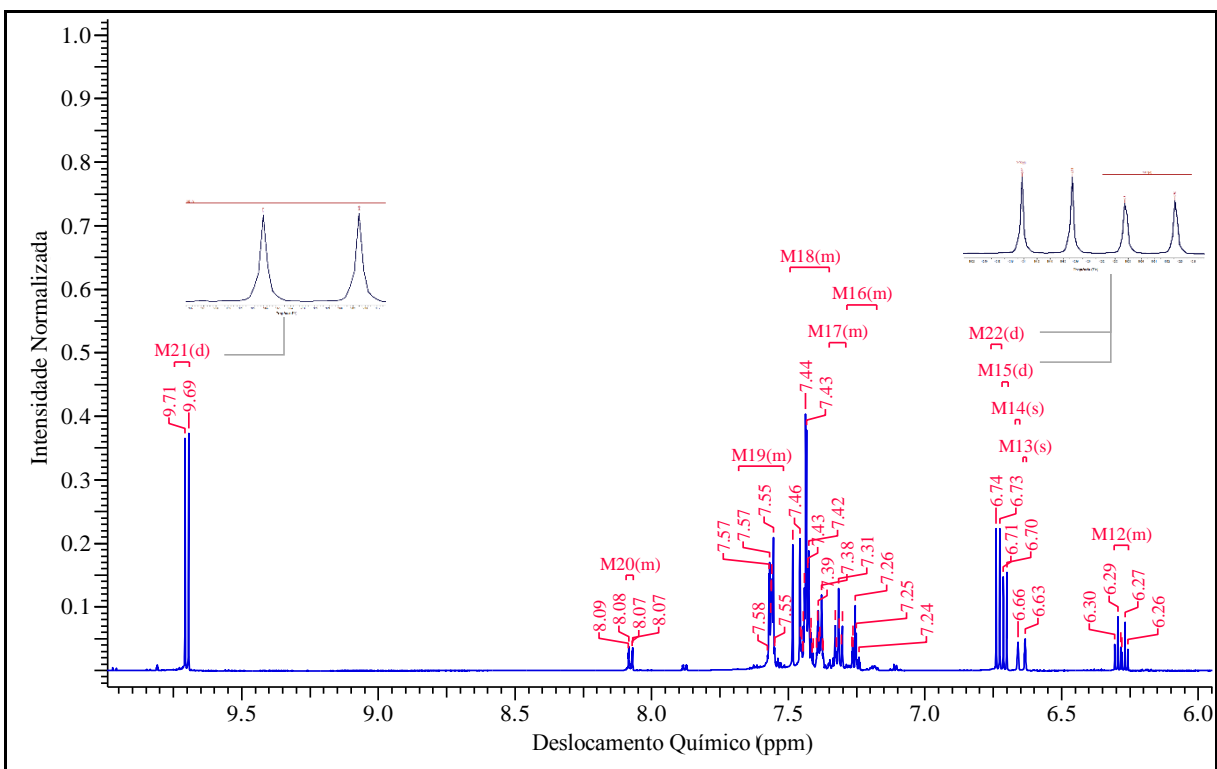


Gráfico 5 – Espectro RMN do OECHVG – multipletos de 6 a 10 ppm

Tabela 9 – Identificação dos multipletos.

Picos	Quantidade de Hidrogênio	Deslocamento Químico (ppm)	Acoplamento de spin	Grupo Funcional	
M01	2	0,834	singleto		
M02	3	0,989	multipleteo		
M03	2	1,051	multipleteo	Alcano (CH ₃ e CH ₂) e monosubstituídos	
M04	4	1,239	multipleteo		
M05	3	1,601	singleto		
M06	5	1,664	multipleteo		
M07	3	2,044	singleto		Ciclo Alqueno e monosubstituídos
M08	9	2,096	multipleteo		
M09	2	2,309	singleto		
M10	5	4,723	multipleteo	Alqueno conjugado	
M11	1	5,361	singleto		
M12	2	6,281	multipleteo		
M13	1	6,633	singleto		
M14	1	6,659	singleto		
M15	2	6,706	dupleteo		
M16	3	7,256	multipleteo	Alqueno Aromático	
M17	5	7,314	multipleteo		
M18	27	7,419	multipleteo		
M19	12	7,562	multipleteo		
M20	1	8,079	multipleteo		
M21	4	9,701	dupleteo		Aldeído
M22	3	6,732	dupleteo	Alqueno Aromático	

Adaptado de (MCMURRY, 2014; PRETSCH *et al.*, 2009).

Resultou, ainda, do espectro de RMN-TF de ¹H do OECHVG que nas regiões entre 0,5 e 3,0 ppm e 7,0 e 8,5 (ppm) são as que possuem as maiores quantidades de hidrogênios (Gráficos 6 e 7). A referida conclusão é obtida a partir observação da área abaixo dos picos de forma integrada, onde a integração de maior área representa a maior quantidade de hidrogênio (Gráfico 8). Assim os hidrogênios mais abundantes localizam-se nos compostos aromáticos do grupo dos alquenos.

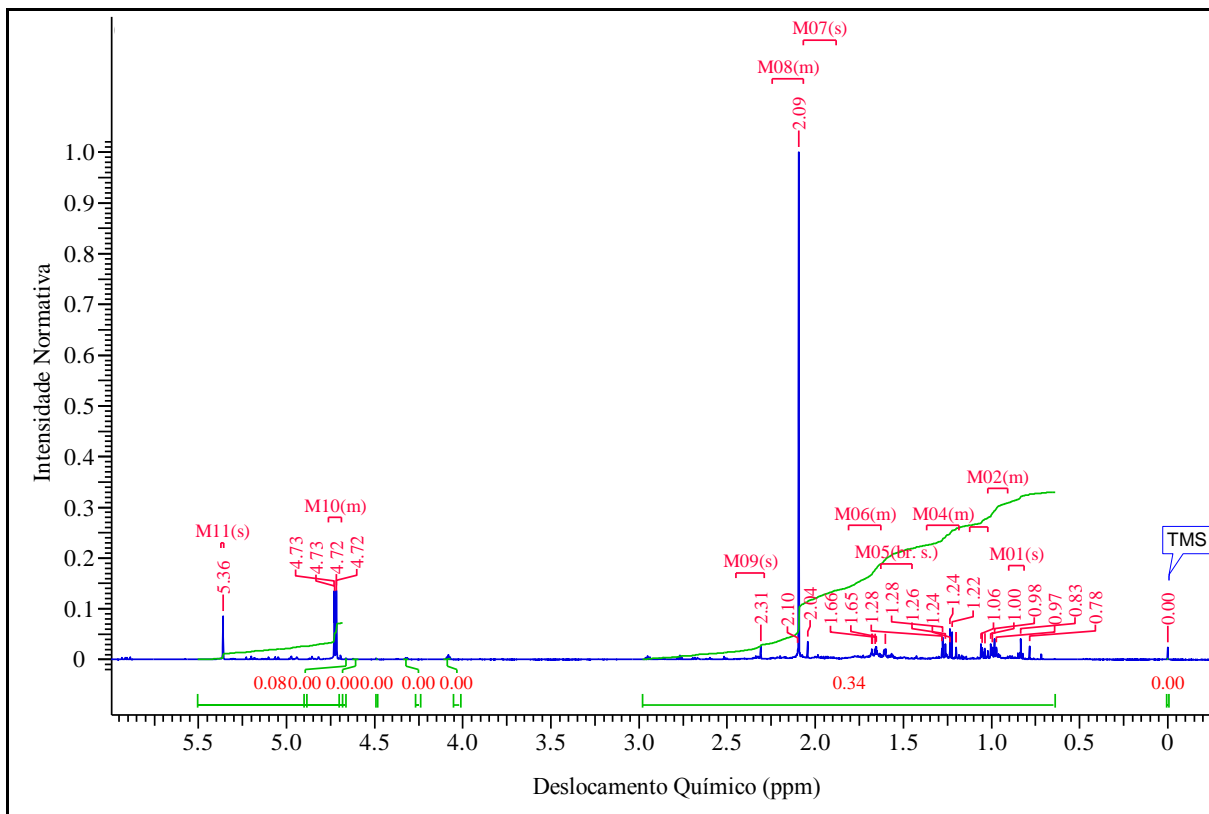


Gráfico 6 – Espectro RMN do OECHVG – integração de 0 a 6 ppm

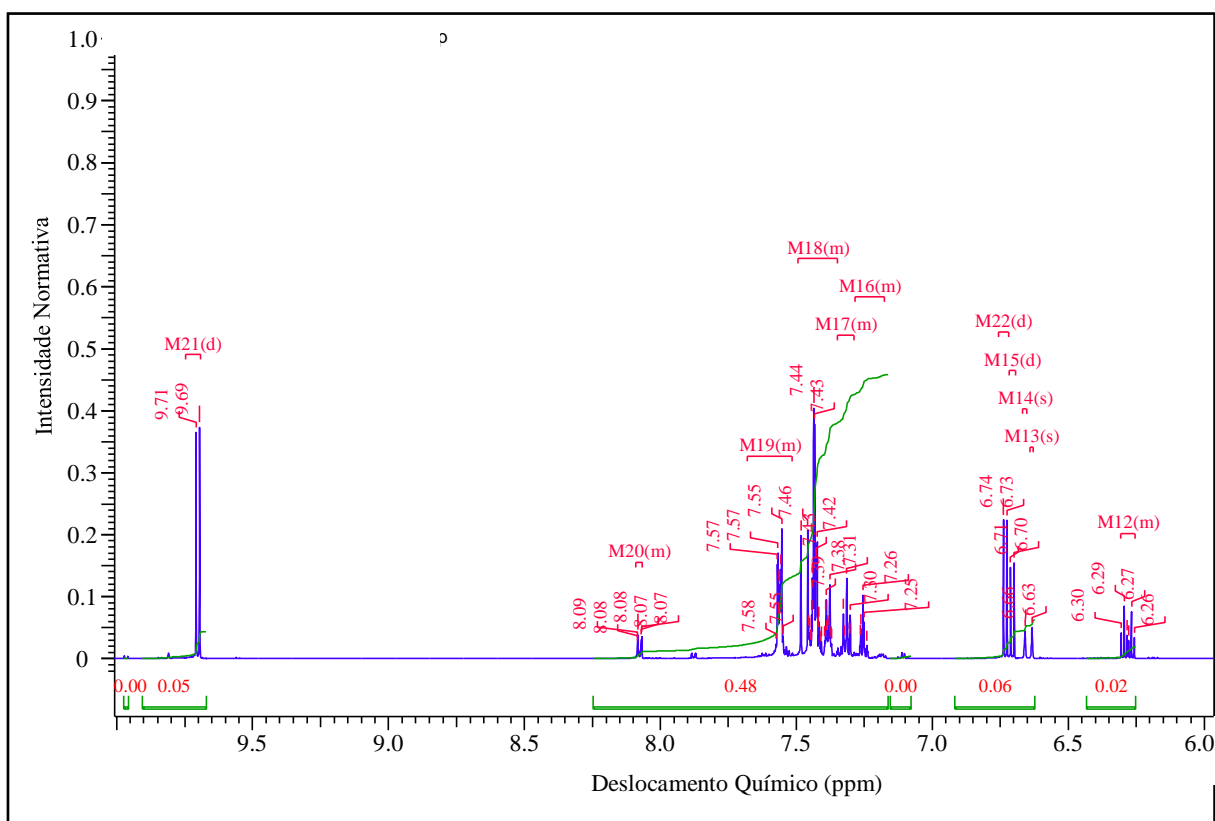


Gráfico 7 – Espectro RMN do OECHVG – integração de 6 a 10 ppm

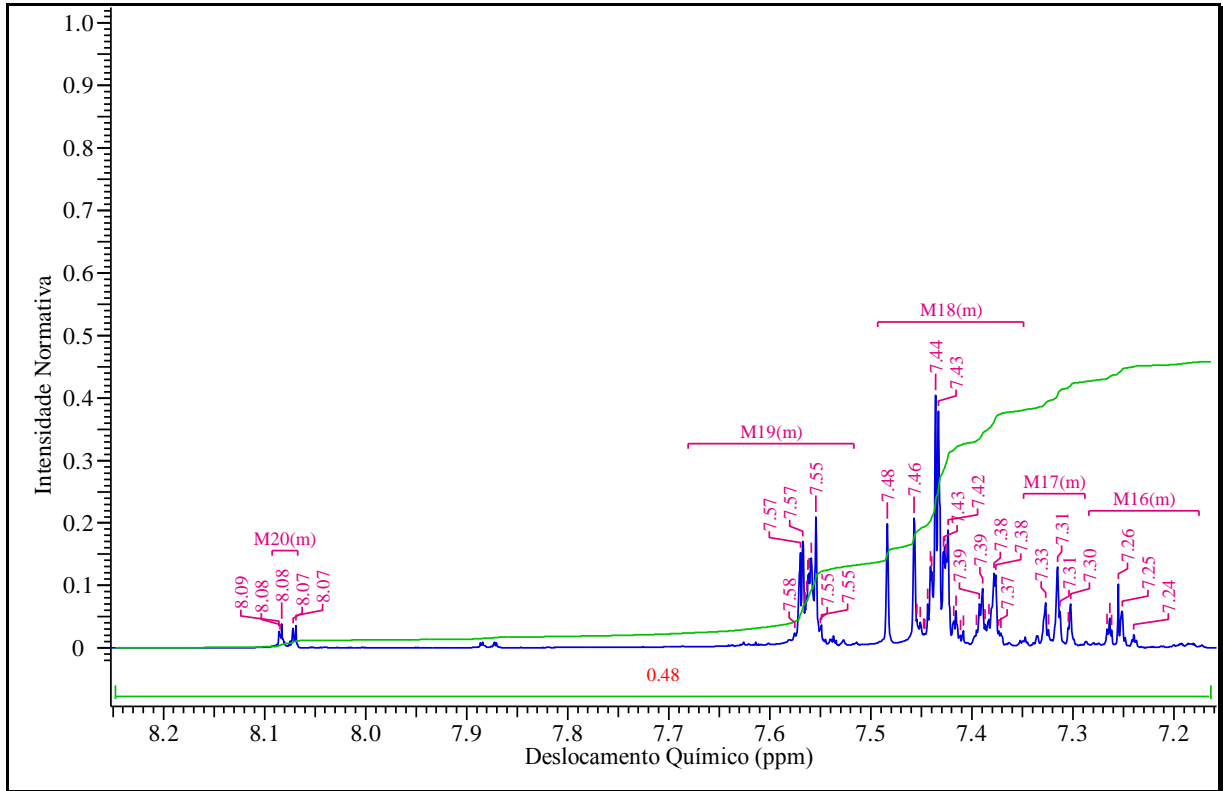


Gráfico 8 – Espectro RMN do OECHVG – maior área de integração

Outros autores, na literatura que analisaram extratos e óleos essenciais obtidos de folhas, galhos e cascas de plantas da família das Lauráceas de espécies específicas, a partir do espectro de ^1H -RMN-FT (Tabela 10).

Tabela 10 – Publicações de análises de ^1H -RMN de OE.

Extratos/Óleo Essencial	Grupos Funcionais	Autor(es)
<i>Cinnamomum cassia</i>	Aldeído e Fenol	(HEIDE, 1972)
<i>Cinnamomum smophloeum</i> Kanehira	Álcool monoterpene, Aldeído e Ácido cinâmico	(FANG <i>et al.</i> , 1989)
<i>Endlicheria citriodora</i> e <i>sericeae</i>	Álcool, Ácido grânico, Éster e monoterpene	
<i>Ocotea Mino</i> , <i>Ceanothifolia</i> e <i>Leucoxyton</i>	Álcool e monoterpene	(YAMAGUCHI, 2011)
<i>Rhodostemonodaphne recurva</i> e <i>crenaticupula</i>	Álcool e monoterpene	
<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	Álcool e monoterpene	(AMAZONAS, 2012)

Fonte: C. A. L. Souza

Assim, comparando os resultados obtidos do espectro de RMN de ^1H do OECHVG com os da sua família (Lauráceas) encontrados na literatura (Tabela 8), observa-se que eles convergem para os grupos funcionais aldeído, monoterpênicos e álcool.

4.10 ANÁLISE DO CG-EM DO OECHVG

O cromatograma obtido a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa do OECHVG, identificou 28 (vinte e oito) espectros de massa (picos), representando a mesma quantidade de compostos (Gráfico 9).

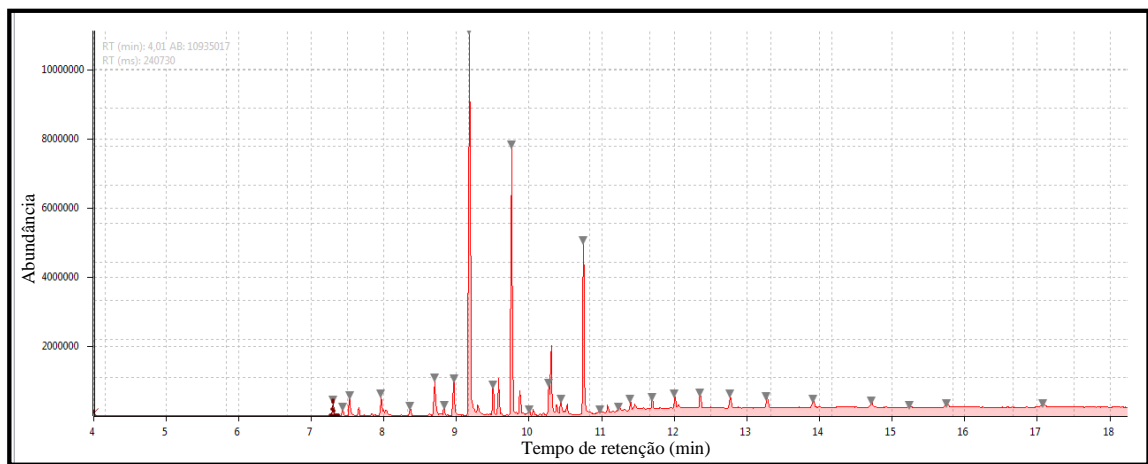


Gráfico 9 – Cromatograma do OECHVG.

Nota-se que o software utilizado pelo cromatógrafo (Shimadzu) identifica os possíveis compostos por correspondência de espectro de massa, por isso, não foi possível identificar com exatidão todos os picos do OECHVG, por que as informações obtidas na leitura não corresponderam consistentemente com as de nenhum composto dos bancos de dados buscados.

Observa-se, ainda, que os picos não identificados na análise dos resultados foram os de menor abundância no OECHVG. Neste sentido, na Tabela 11 apresenta-se 12 (doze) compostos de maior abundância identificados no OECHVG em ordem de leitura do aparelho (número do pico), com tempo de retenção (TR) em minutos (min), percentual da área do pico, nome do composto, fórmula molecular e fórmula estrutural.

Tabela 11 – Identificação dos compostos por meio do CG-EM.

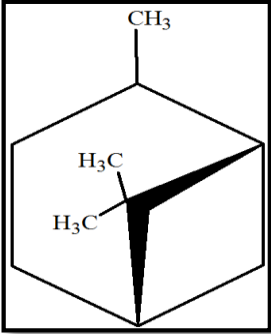
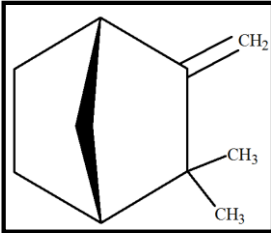
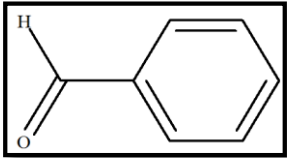
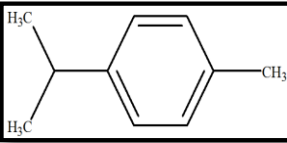
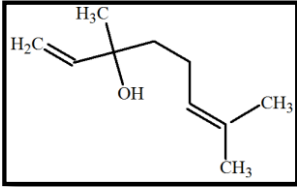
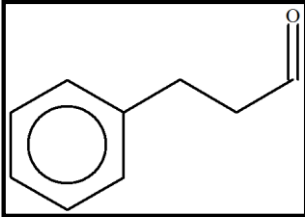
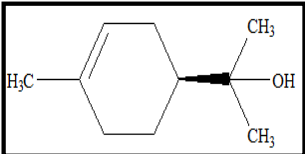
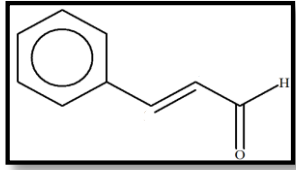
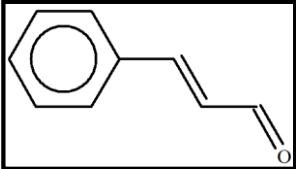
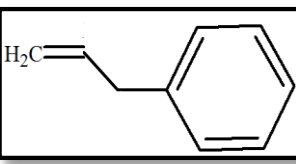
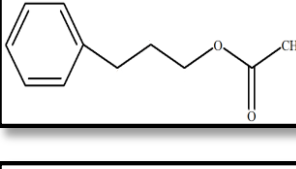
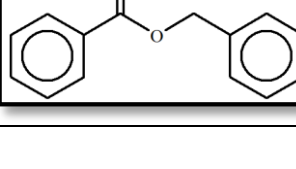
Pico	TR (min)	% da Área	Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
1	7,3	1,12	α -pineno	$C_{10}H_{16}$	
2	7,433	0,59	Canfeno	$C_{10}H_{16}$	
3	7,533	1,72	Benzaldeído	C_7H_6O	
4	7,967	1,93	<i>p</i> -isopropil-tolueno	$C_{10}H_{14}$	
5	8,367	0,77	Linalol	$C_{10}H_{18}O$	
6	8,7	3,33	3-fenil-propanal	$C_9H_{10}O$	
7	8,833	0,72	α -terpineol	$C_{10}H_{18}O$	

Tabela 11 – Continuação

8	8,967	3,13	Cinamaldeído	C ₉ H ₈ O	
9	9,183	36,69	3-fenil-2-propenal	C ₉ H ₈ O	
10	9,508	2,26	3-fenil-propeno	C ₉ H ₁₀	
11	9,758	20,60	Acetato de 2-fenil-propila	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	
12	10,75	13,40	Benzoato de benzila	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	

Fonte: (NIST, 2010).

Da análise dos resultados, dos 100% dos picos obtidos, identificou-se 86,27 %, com a seguinte composição majoritária do OECHVG: 3-fenil-2-propenal (36,69%); acetato de 2-fenil-propila (20,60%); benzoato de benzila (13,40%); 3-fenil-propanal (3,33%); cinamaldeído (3,13%); 3-fenil-propeno (2,26%); *p*-isopropil-tolueno (1,93%); benzaldeído (1,72%); α -pineno (1,12%); linalol (0,77%); α -terpineol (0,72%); canfeno (0,59%).

Em outros estudos encontrados na literatura a partir da análise por CG-EM de outra espécie de *Cinnamomum*, encontrou-se a indicação de compostos compatíveis com o OECHVG. Andrade (2010) e Probst (2012), ao analisarem a *Cinnamomum zeylanicum* também identificaram α -pineno, canfeno, benzaldeído, linalol, α -terpineol e cinamaldeído. Já Unlu (2010) e Freire (2011), ao estudarem a *Cinnamomum zeylanicum* Blume apontaram como existentes no óleo essencial o cinamaldeído e o α -pineno, também presentes no OECHVG.

Nos gráficos 10 a 21 estão os espectros de massa dos compostos majoritários do OECHVG.

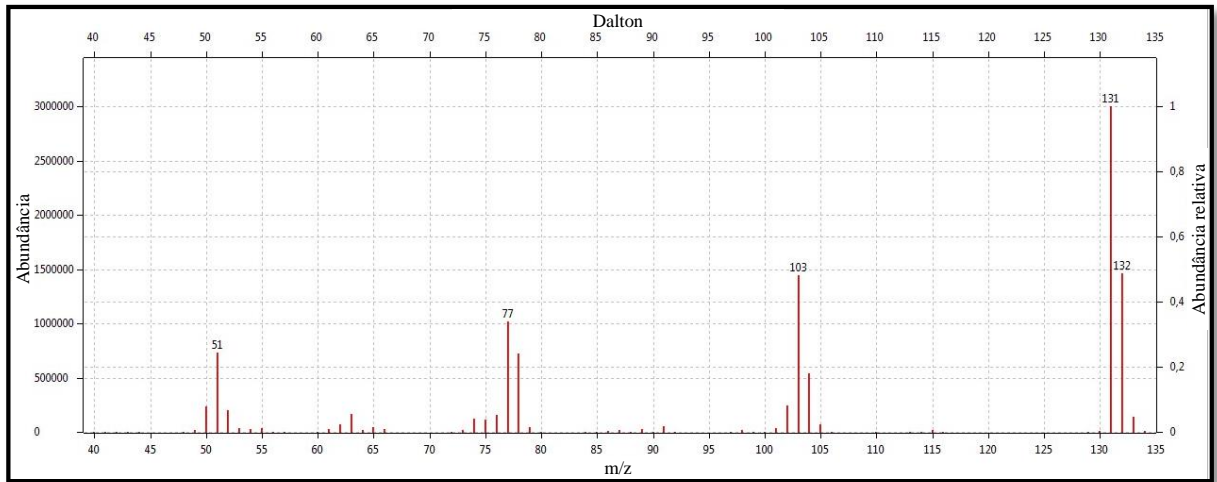


Gráfico 10 – Espectro de massa do 3-fenil-2-propenal

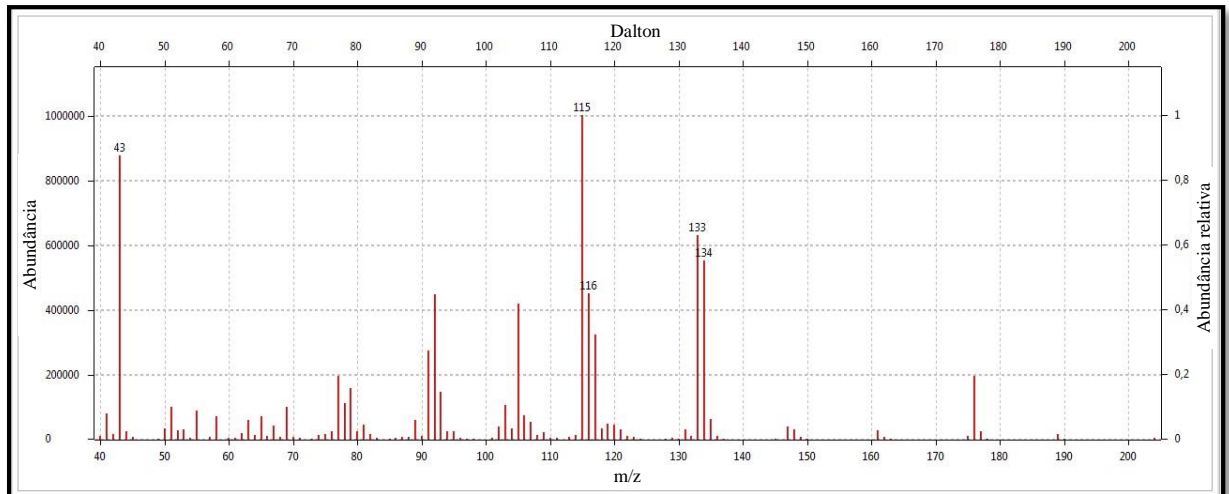


Gráfico 11 – Espectro de massa do Acetato de 2-fenil-propila

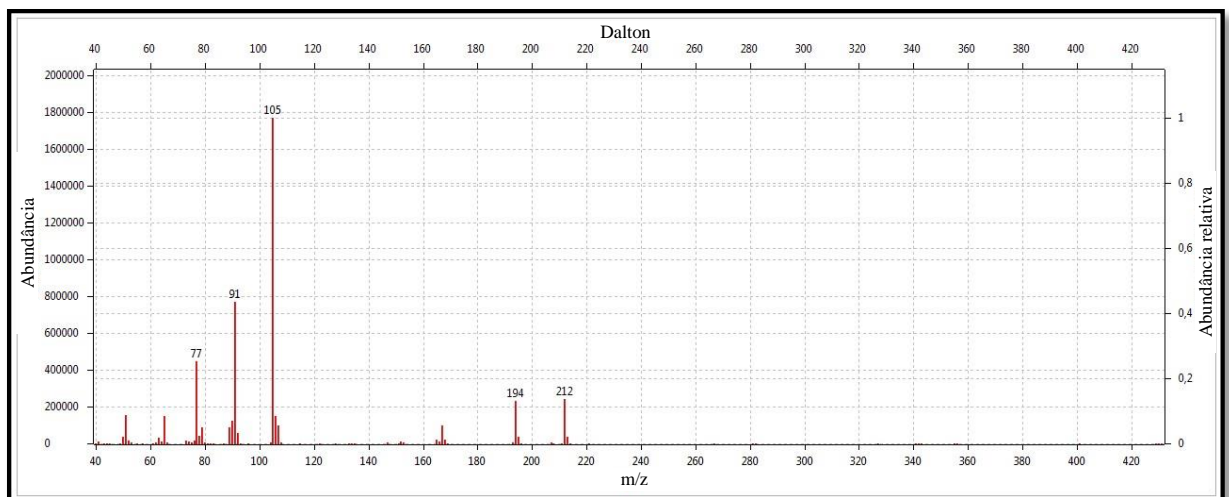


Gráfico 12 – Espectro de massa do benzoato de benzila

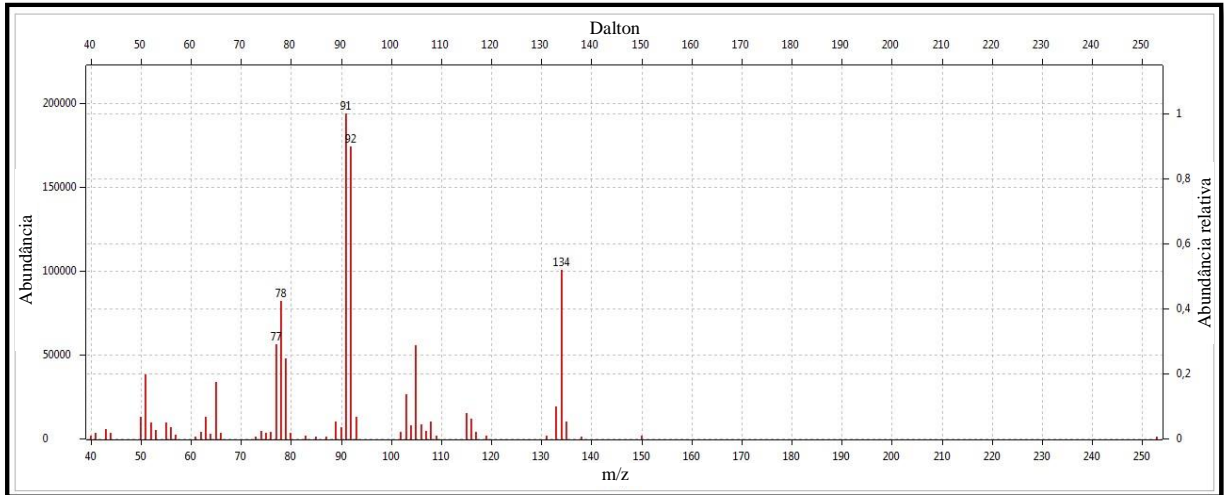


Gráfico 13 – Espectro de massa do 3-fenil-propanal

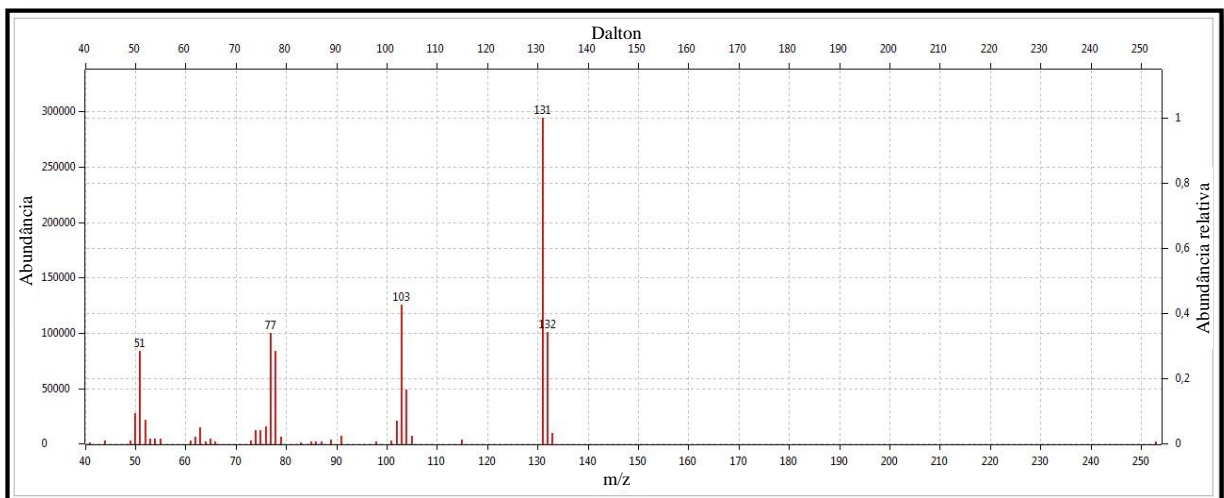


Gráfico 14 – Espectro de massa do cinamaldeído

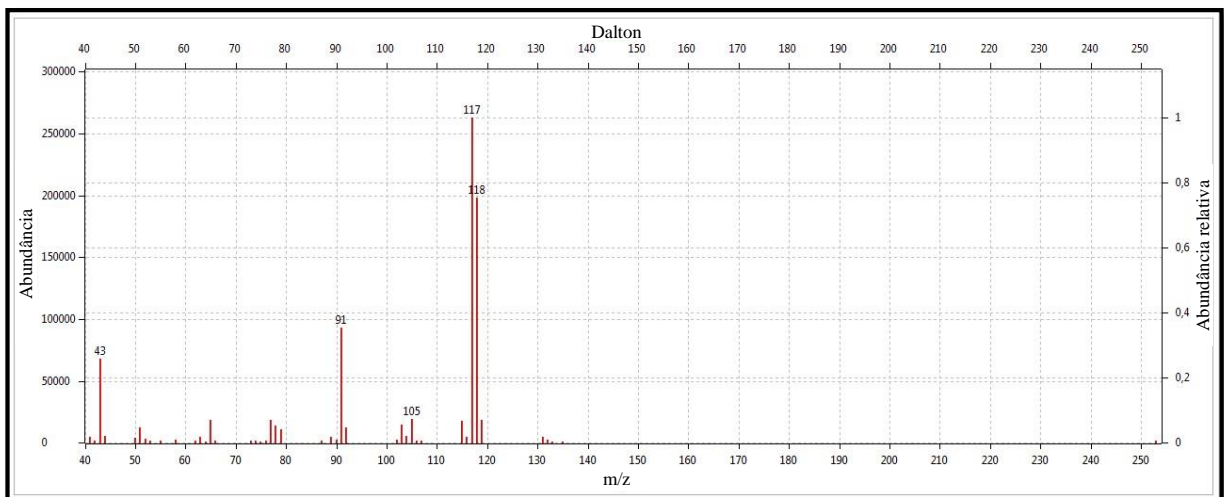


Gráfico 15 – Espectro de massa do 3-fenil-propeno

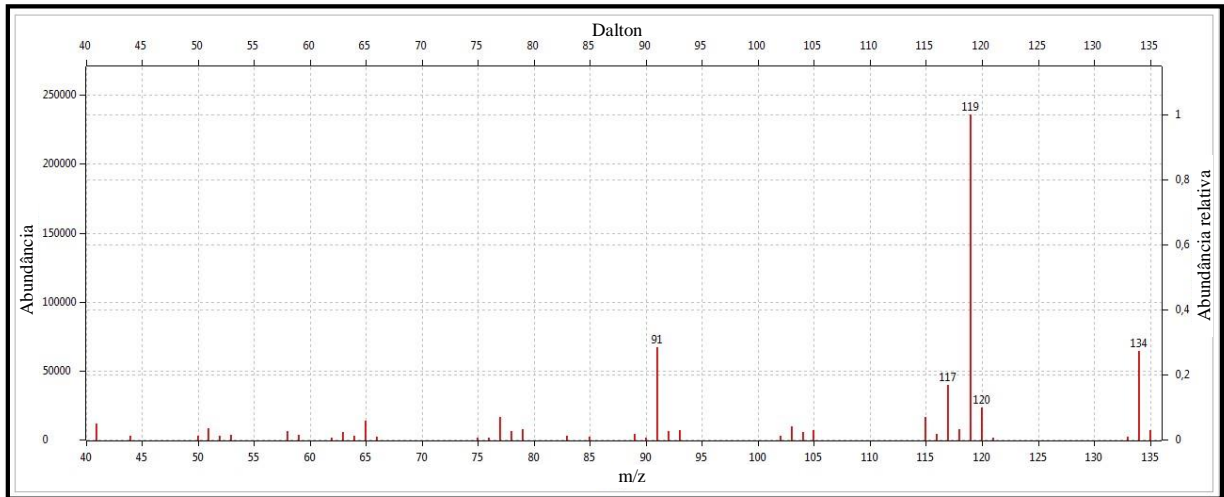


Gráfico 16 – Espectro de massa do *p*-isopropil-tolueno

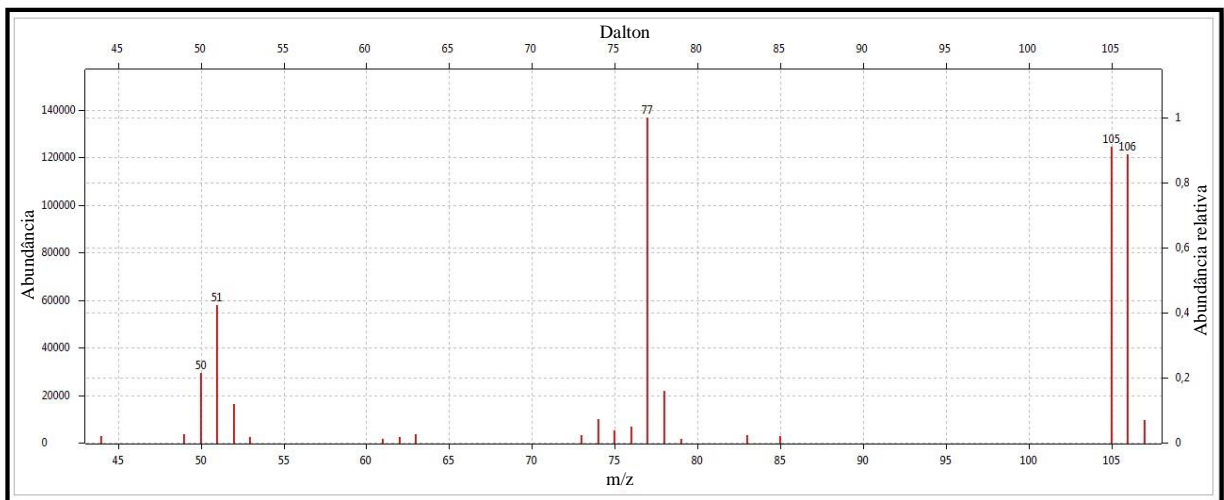


Gráfico 17 – Espectro de massa do benzaldeído

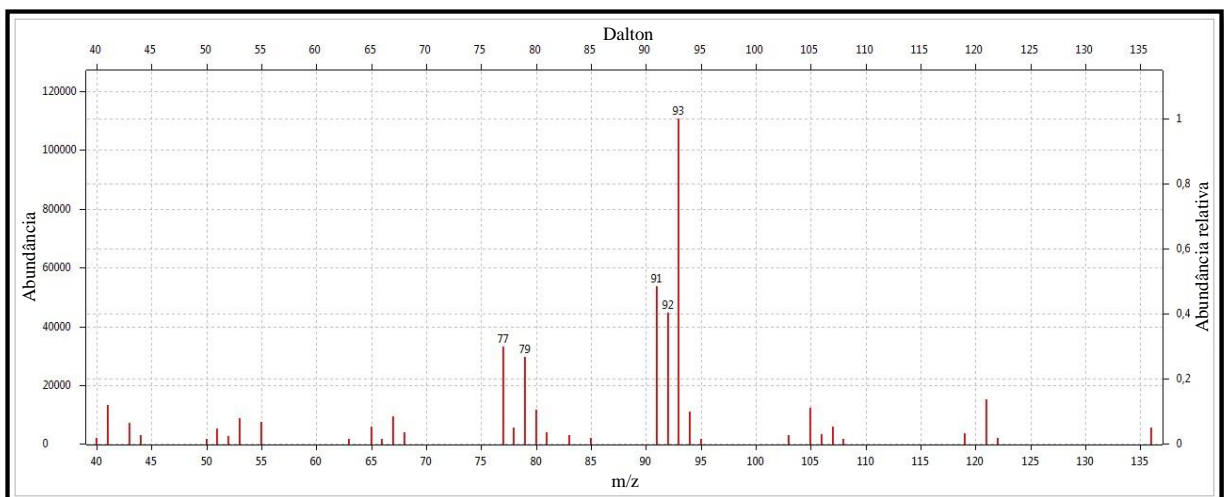


Gráfico 18 – Espectro de massa do α -pineno

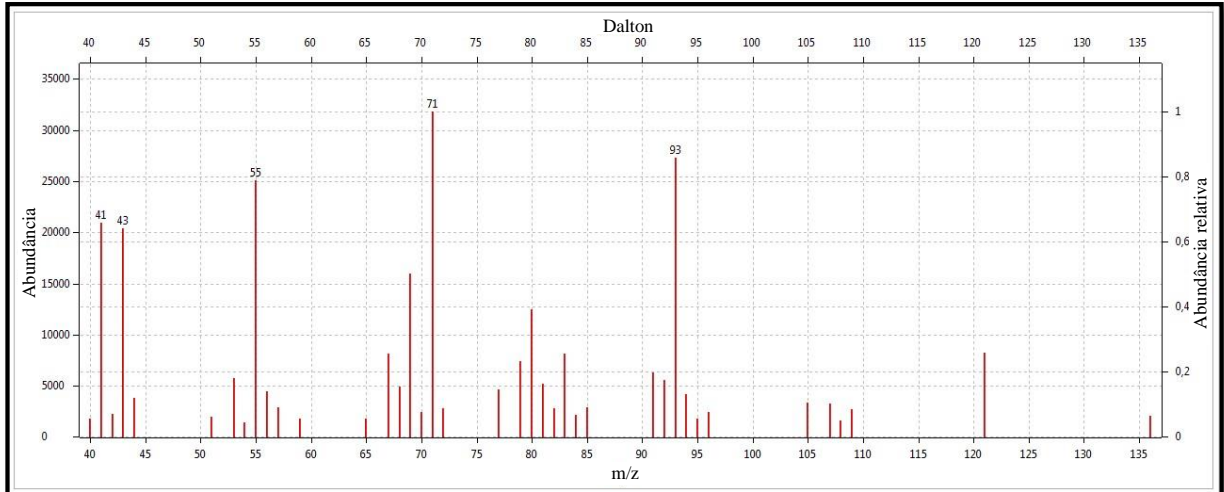


Gráfico 19 – Espectro de massa do linalol

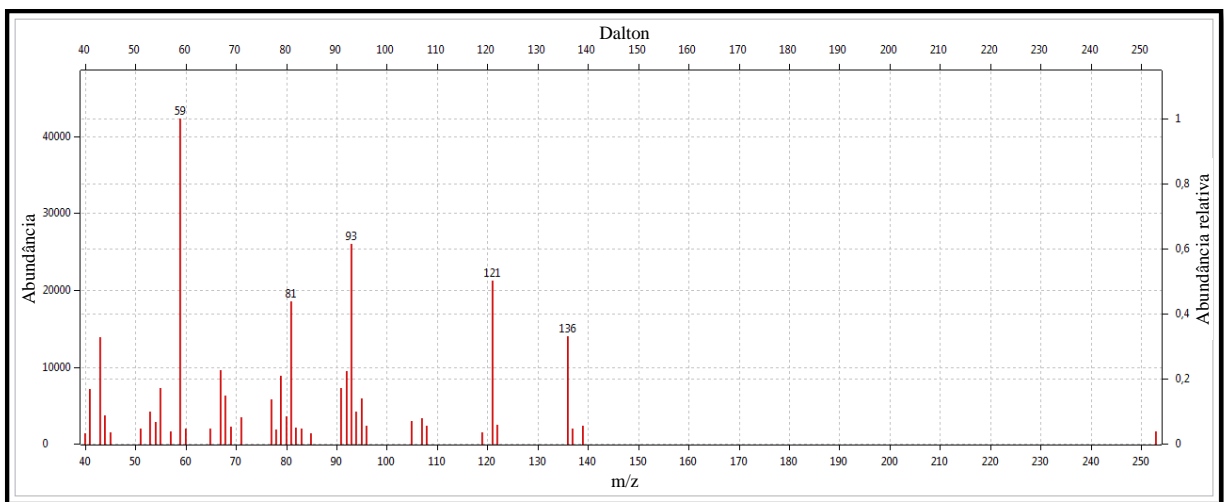
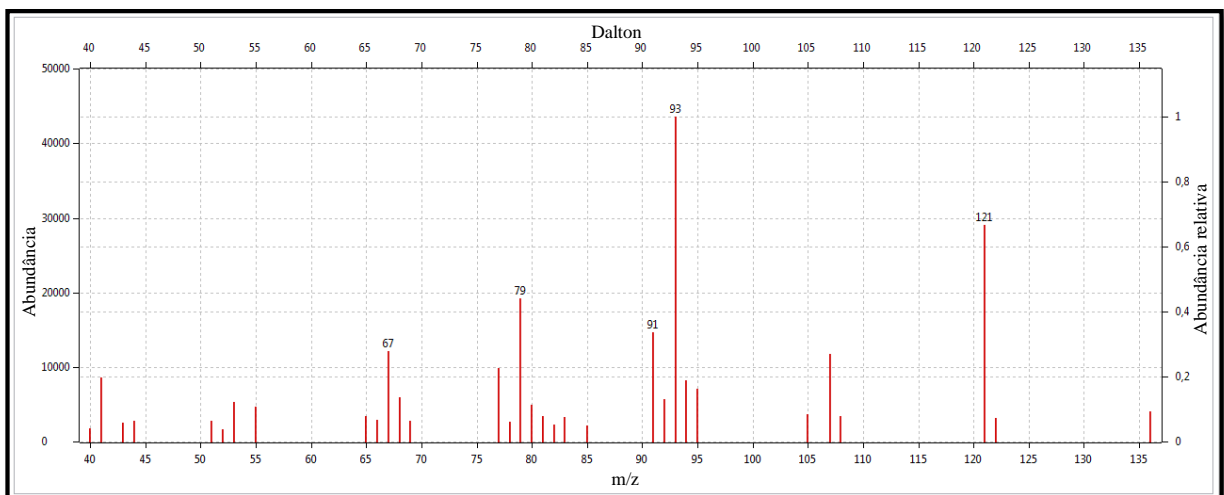
Gráfico 20 – Espectro de massa do α -terpineol

Gráfico 21 – Espectro de massa do canfeno

Em comparação com os espectros de massa da base de dados do NIST, os espectros de massa obtidos da análise do OECHVG indicaram a existência os seguintes compostos: α -pineno; canfeno; *p*-isopropil-tolueno; linalol; α -terpineol pertencem ao grupo dos monoterpenos que correspondem a 5,13 % da composição do OECHVG; e os compostos benzaldeído, 3-fenil-propanal; cinamaldeído; 3-fenil-2-propenal; 3-fenil-propeno; acetato de 2-fenil-propila; benzoato de benzila pertencem ao grupo dos aldeídos que correspondem ao grupo majoritário do OECHVG representando 81,14 %.

Os compostos identificados no presente trabalho se alinham aos encontrados em várias espécies de *Cinnamomum* disponíveis na literatura (Tabela 12)

Tabela 12 – Compostos encontrados na literatura.

Espécie	Compostos	Autor(es)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	Eugenol (82,67%), Cariofileno (12,18%) e Humuleno (2,47%)	(MENDES, 2011)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Aldeído Cinâmico (87,7%) e α -Pineno (7,98%)	(FREIRE <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	Eugenol (87,37%), Cinamaldeído (1,70%), 2-Metil-5-(Metiletenil)-Ciclohexanol (2,14%), Farnesol (1,45%), Trans-Cariofileno (6,31%) e α -Cariofileno (1,05%)	(DIAS, 2009)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Benzoato de Benzila (65,39%), Linalol (5,37%), E-Cinamaldeído (3,97%), α -Pineno (3,95%), β -Felandreno (3,42%), Eugenol (3,36%) e Benzaldeído (2,68%)	(MONTEIRO, 2013)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	α e β -Pineno (9,9%; 3,5%), α -Felandreno (9,2%), p-Cimeno (6,2%), Limoneno (7,9%), Linalol (10,6%); α -Copaeno (3,3%), (β)-Cariofileno (6,7%), Óxido de Cariofileno (3,1%), (E)-cinamaldeído (7,8%) e Acetato de (E)-Cinamila (9,7%)	(LIMA <i>et al.</i> , 2005)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	Cinamaldeído (79,3%) e eugenol (11,9%)	(GENDE <i>et al.</i> , 2008)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Bark	(E)-Cinnamaldehyde (68,95%), Benzaldeído (9,94%), (E)-Cinnamyl Etilo (7,44%), Limoneno (4,42%) e Eugenol (2,77%)	(UNLU <i>et al.</i> , 2010)

Fonte: C. A. L. Souza

Os compostos majoritários do OECHVG, 3-fenil-2-propenal, acetato de 2-fenil-propila e benzoato de benzila, possuem características específicas que despertam interesse para o isolamento e aplicações tais como aroma, propriedades antibacteriana e antifúngica.

O 3-fenil-2-propenal, líquido oleoso de cor amarela é o que caracteriza a canela pelo odor penetrante, por isso é utilizado como aromatizantes e matéria prima de perfumes. Além disso, também é utilizado como base para síntese de outras substâncias importantes na indústria química (ROJAS *et al.*, 2012).

Na investigação da atuação do 3-fenil-2-propenal extraído da canela e do eucalipto contra três patógenos de importância na indústria de alimentos concluiu-se que o aldeído cinâmico (3-fenil-2-propenal) emulsionado foi mais eficaz que o óleo essencial do eucalipto na inibição de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (SILVA, 2014b).

O acetato de 2-fenil-propila existente na canela é um dos compostos com maior efeito antimicrobiano (PHILIPPI *et al.*, 1995). Outro provável efeito do acetato de 2-fenil-propila, identificado a partir do emprego do óleo essencial da canela em alface, é a inibição da germinação e crescimento de plantas (ALVES *et al.*, 2004).

O benzoato de benzila, encontrado em 13,40% do OECHVG é um composto conhecido e utilizado como medicamento sarnicida e ação acaricida e já é disponível no mercado com os seguintes nomes: Miticoçan; Parasimed; Acarsan; Benzotisan; Sarnilab; Zilaben. É utilizado contra pediculose (piolhos e lêndeas) e escabiose (sarna) (SILVA, 2014a). Além disso, também já se obteve ação carrapaticida no controle de carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* com o benzoato de benzila (MONTEIRO, 2013).

Os 13,73 % dos espectros de massas referentes a picos não identificados do OECHVG estão apresentados na Tabela 13 e gráficos 22 a 37.

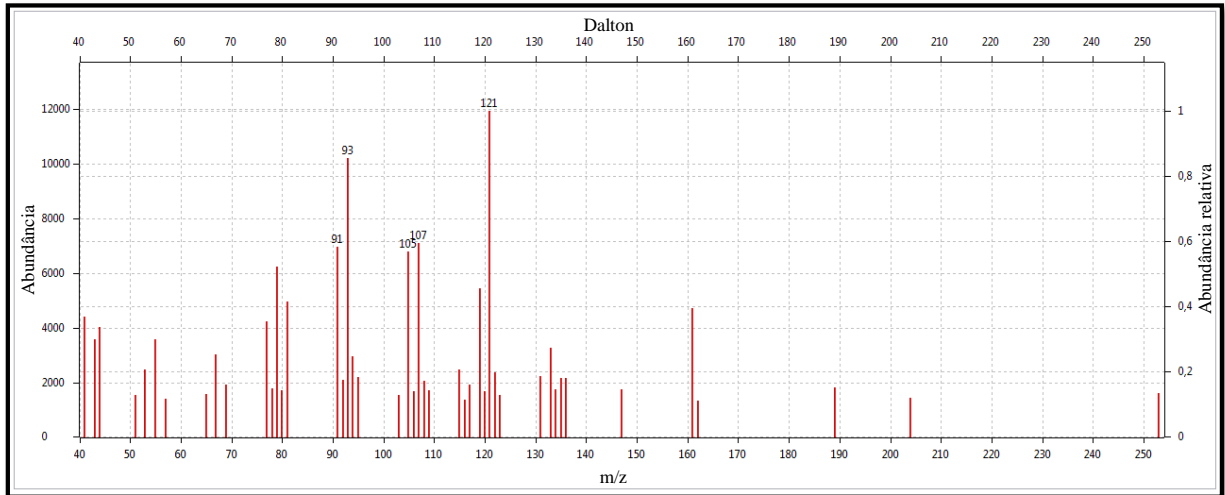
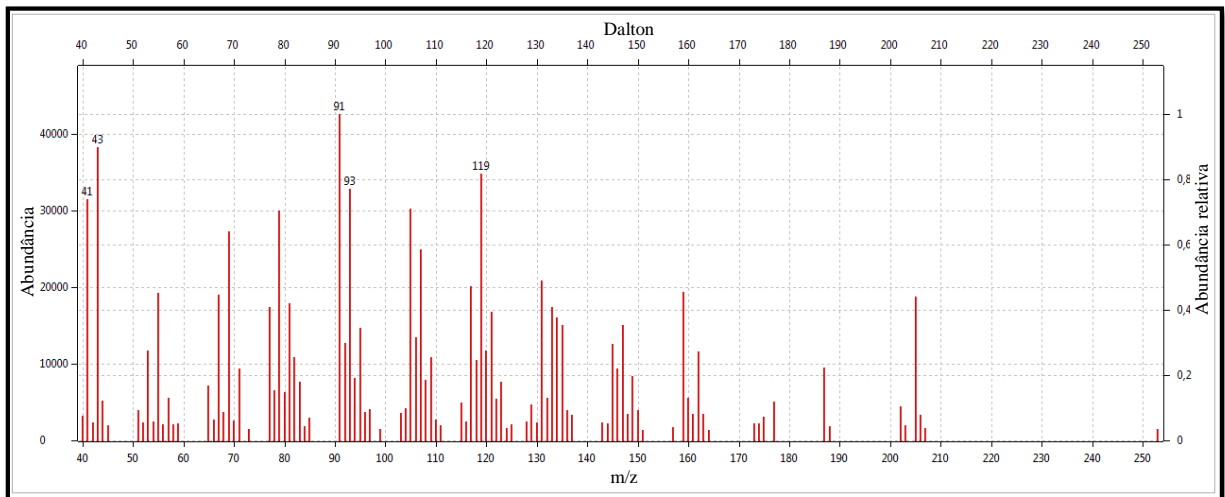
Tabela 13 – Picos não identificados.

Pico	Gráfico	TR (min)	% da Área
13	22	10,008	0,63
14	23	10,275	1,54
15	24	10,442	1,22
16	25	10,975	0,23
17	26	11,242	0,57
18	27	11,400	0,80
19	28	11,700	0,78
20	29	12,008	1,01
21	30	12,358	1,09
22	31	12,775	1,22
23	32	13,275	1,11
24	33	13,908	1,03

Tabela13 - Continuação

25	34	14,717	0,81
26	35	15,242	0,22
27	36	15,750	0,67
28	37	17,083	0,80

Fonte: C. A. L. Souza

**Gráfico 22 – Espectro de massa do pico 13****Gráfico 23 – Espectro de massa do pico 14**

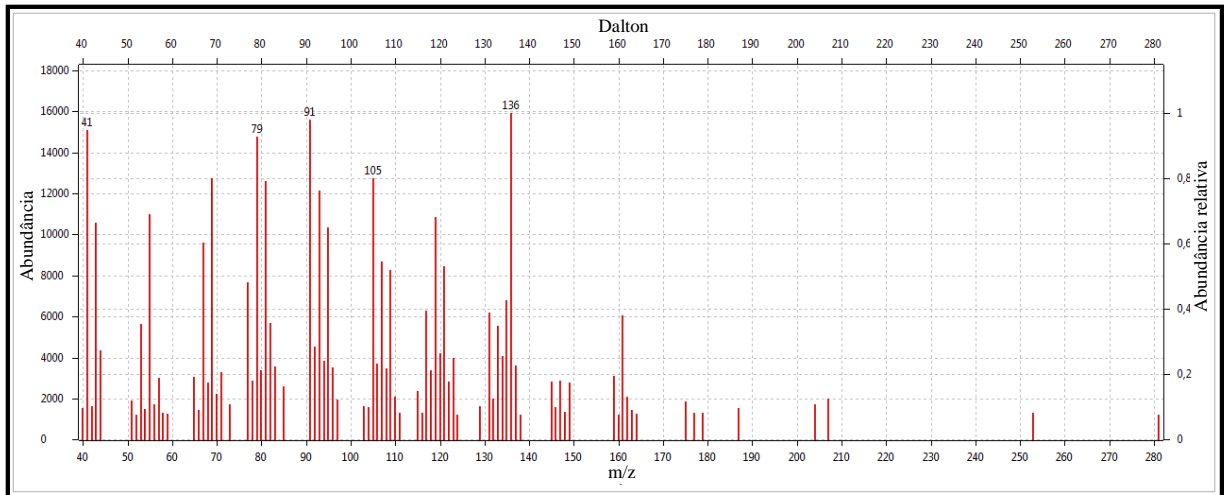


Gráfico 24 – Espectro de massa do pico 15

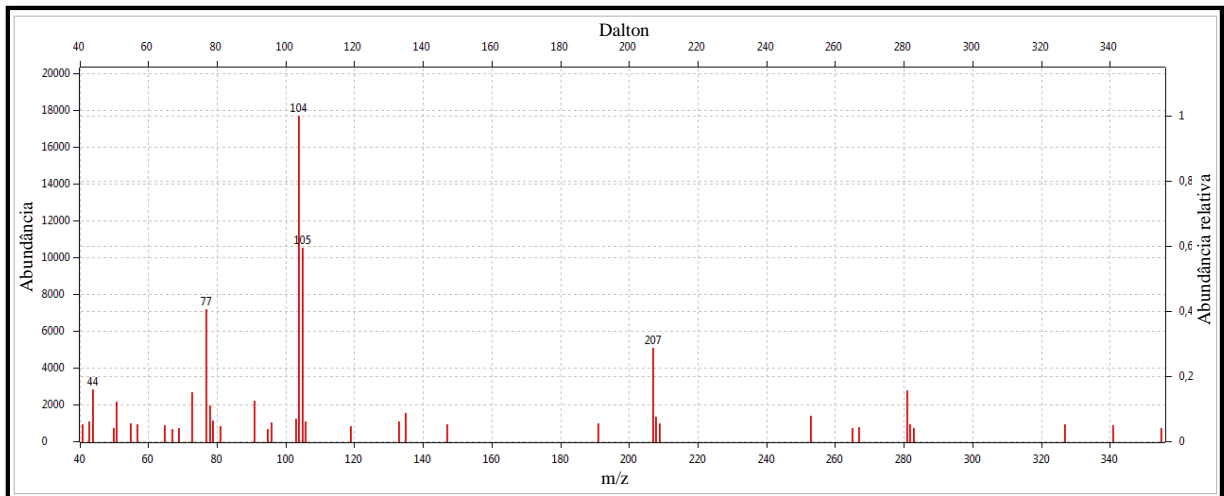


Gráfico 25 – Espectro de massa do pico 16

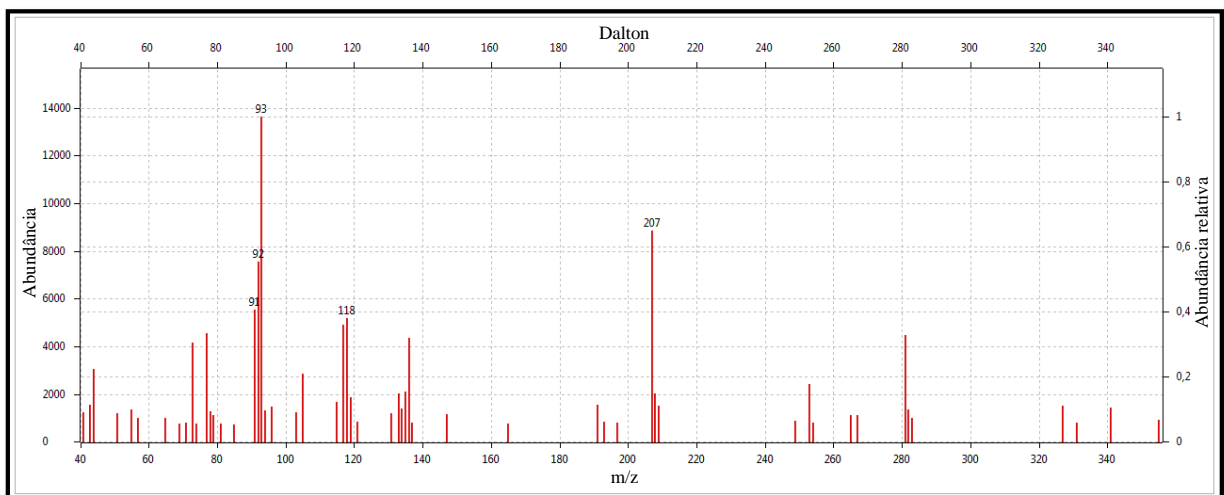


Gráfico 26 – Espectro de massa do pico 17

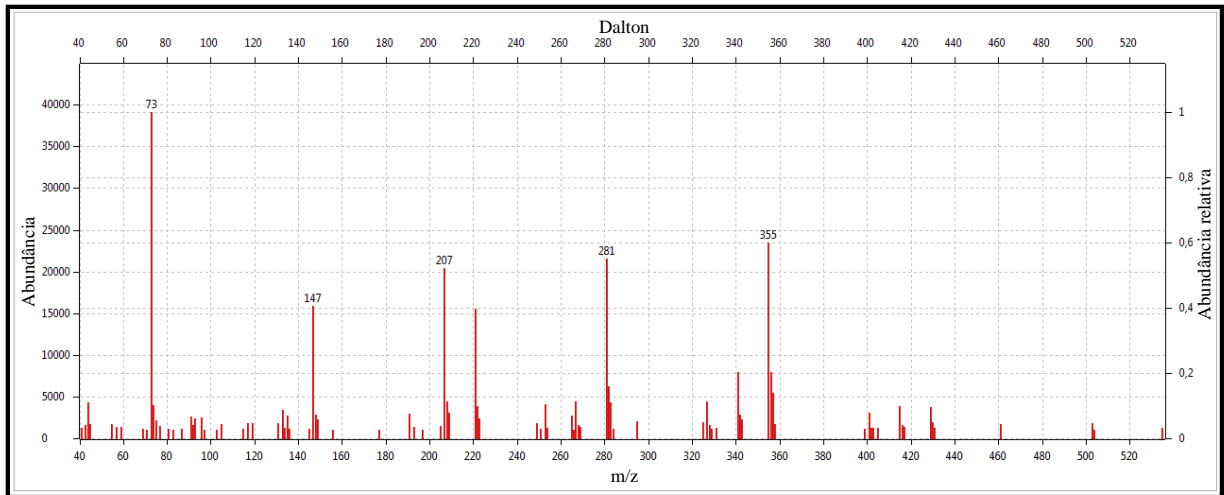


Gráfico 27 – Espectro de massa do pico 18

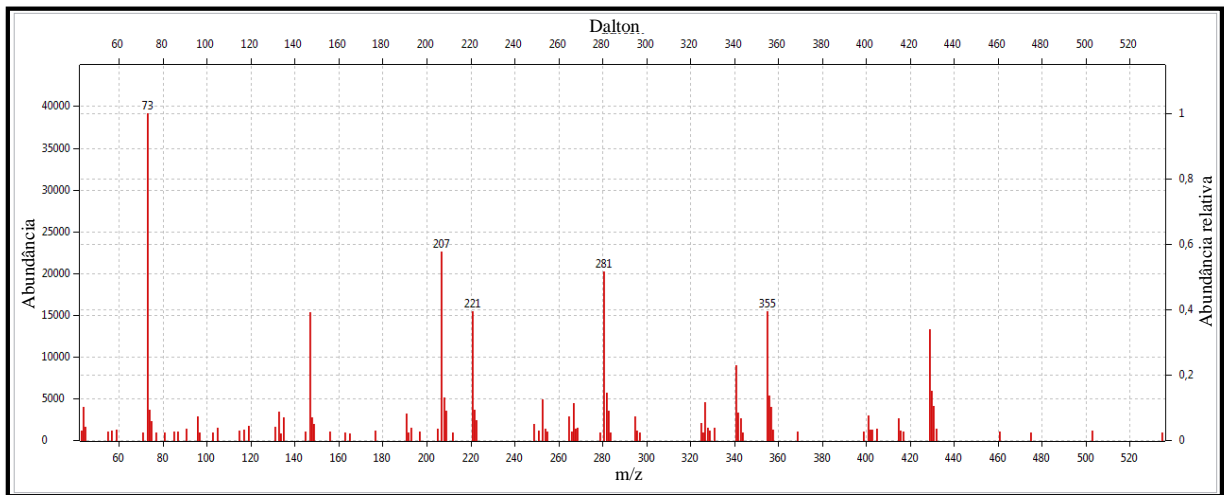


Gráfico 28 – Espectro de massa do pico 19

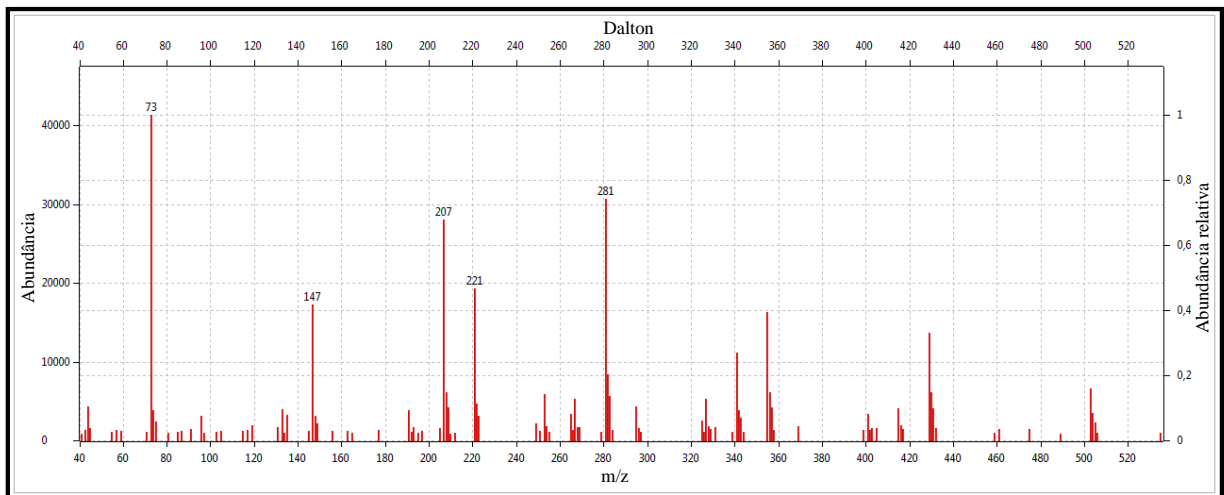


Gráfico 29 – Espectro de massa do pico 20

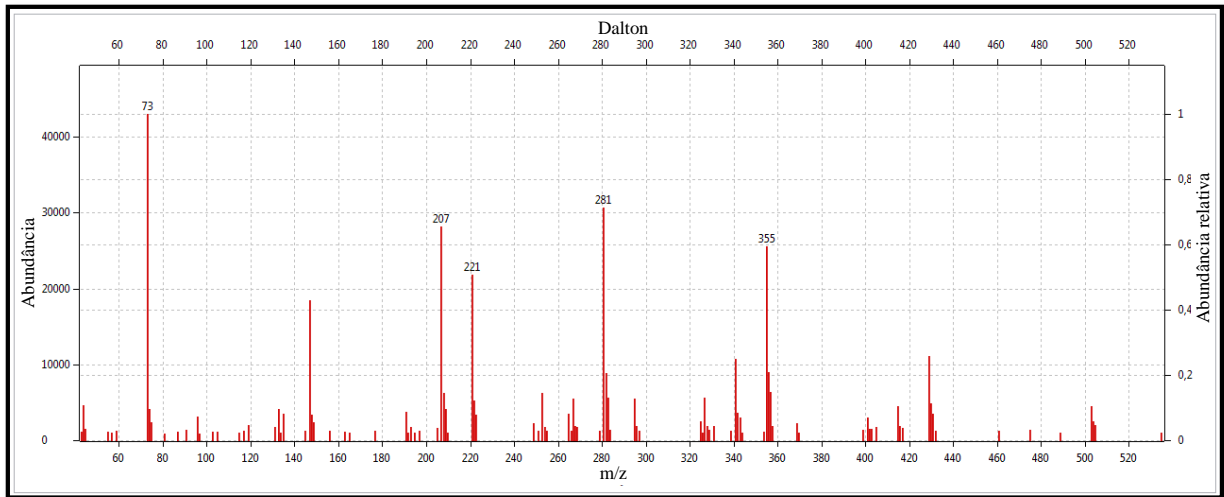


Gráfico 30 – Espectro de massa do pico 21

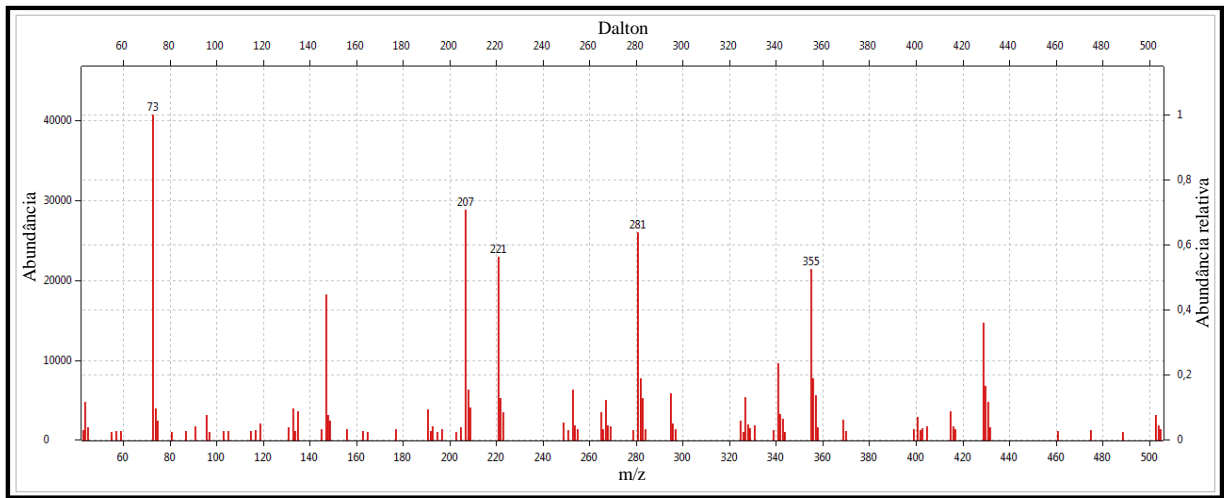


Gráfico 31 – Espectro de massa do pico 22

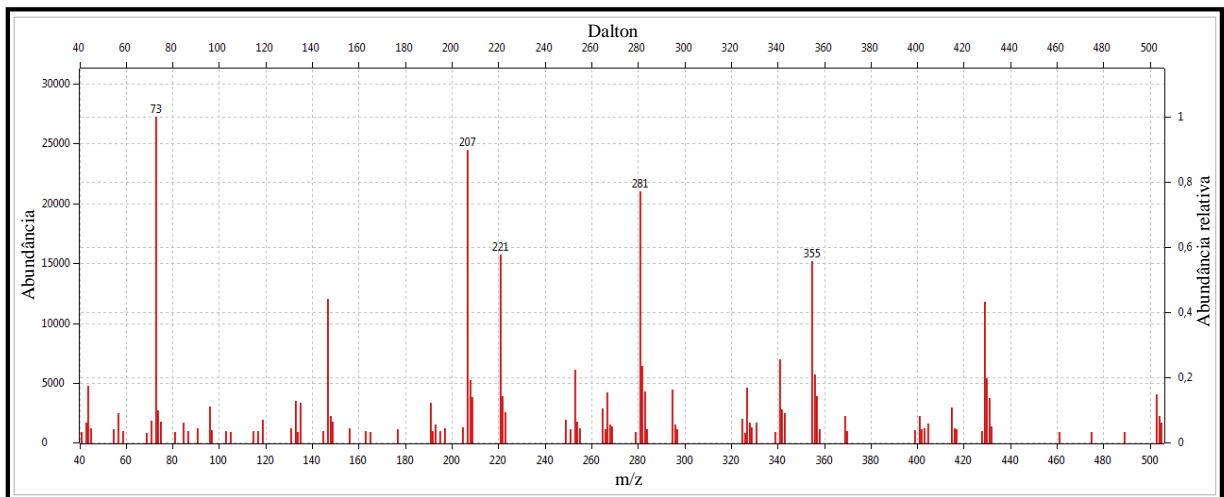


Gráfico 32 – Espectro de massa do pico 23

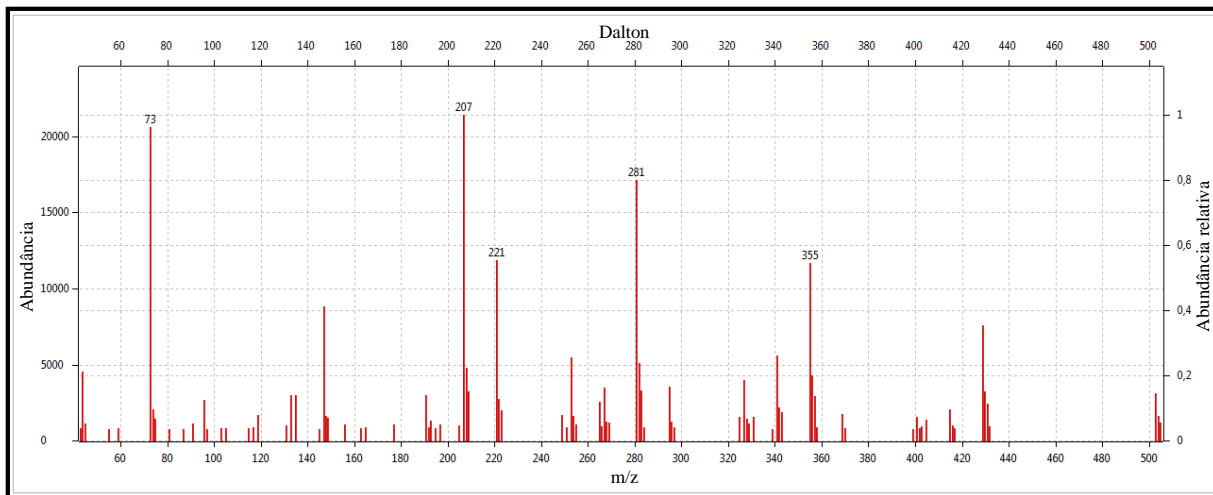


Gráfico 33 – Espectro de massa do pico 24

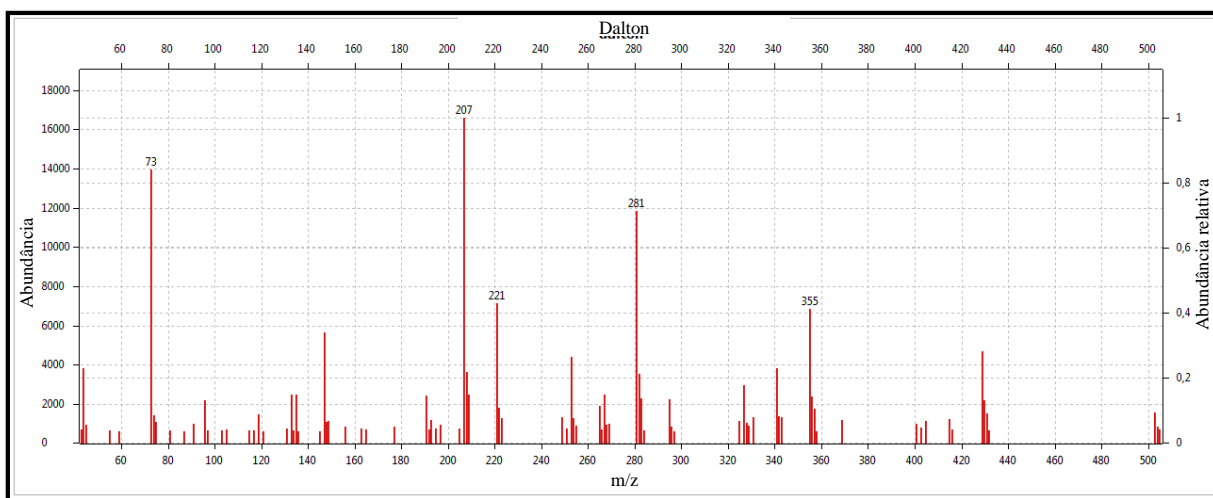


Gráfico 34 – Espectro de massa do pico 25

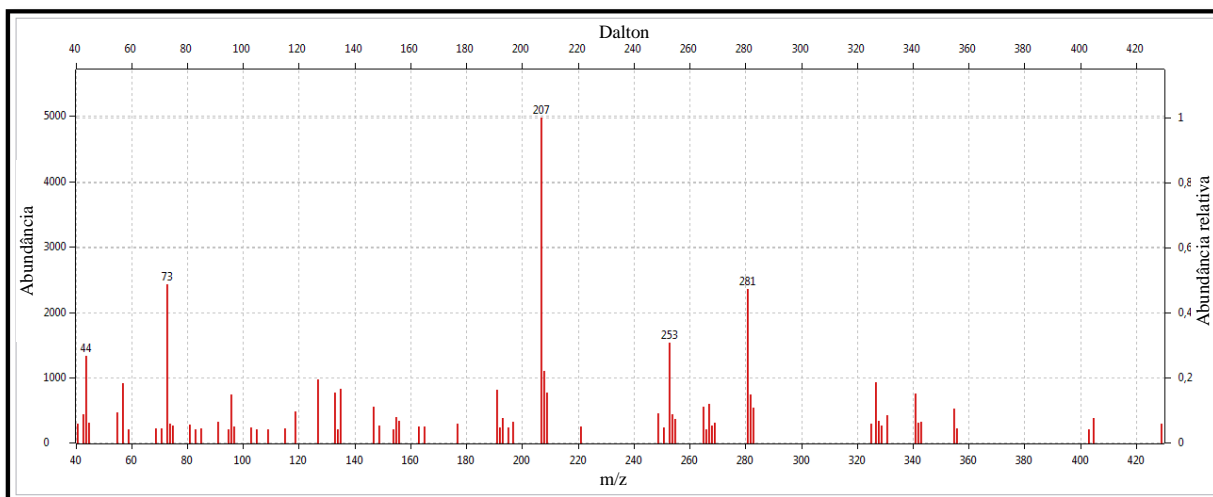


Gráfico 35 – Espectro de massa do pico 26

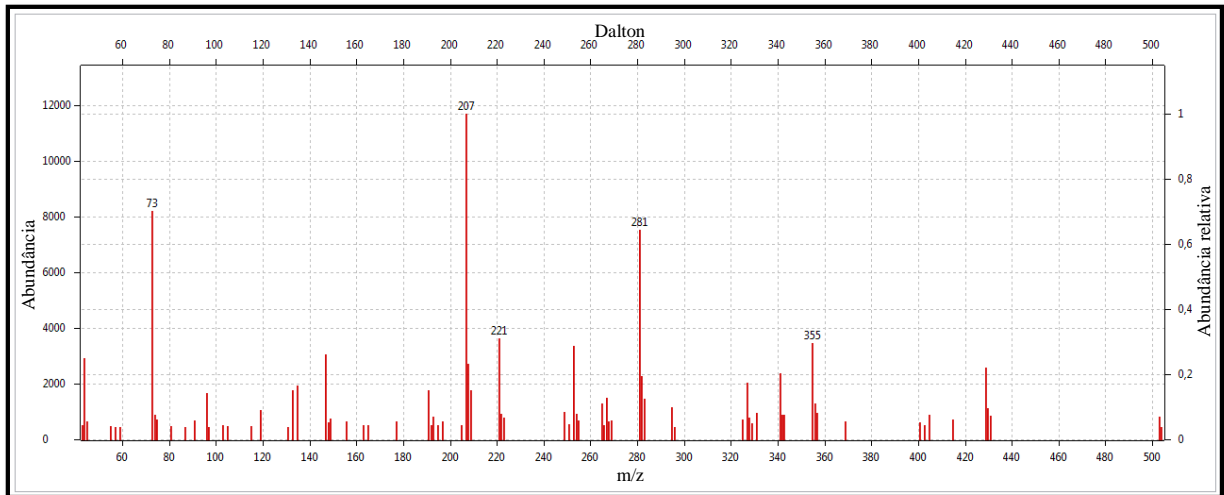


Gráfico 36 – Espectro de massa do pico 27

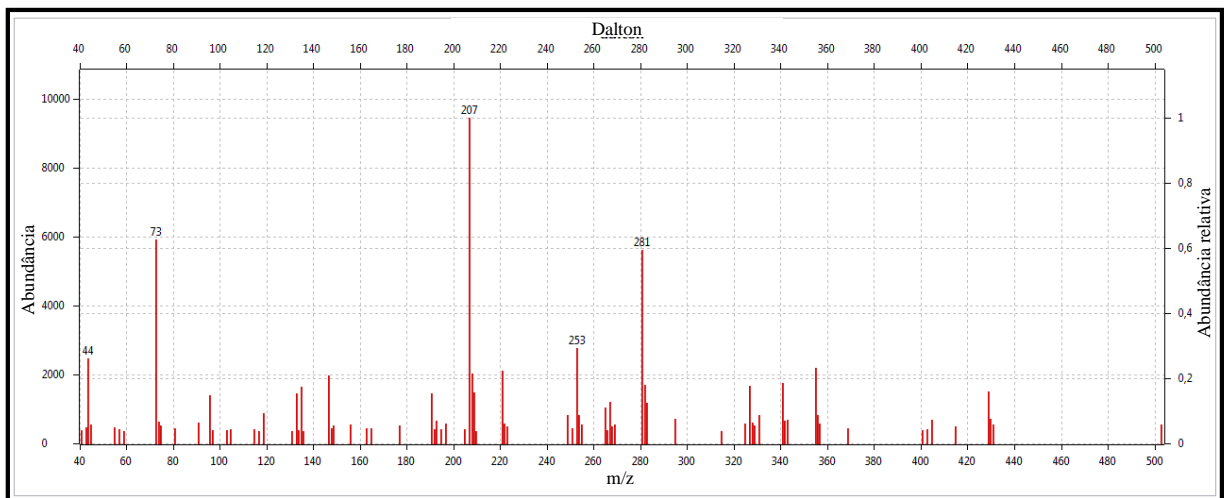


Gráfico 37 – Espectro de massa do pico 28

4.11 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS EMULSIONADOS

Para caracterização do sistema emulsionado obtido a partir do OECHVG as 8 (oito) formulações obtidas em 27 de fevereiro de 2015, com EHL de 8 (oito) a 15 (quinze) respectivamente foram submetidas ao teste de centrifugação e ao *Zeta/Size* na data de 17 de março de 2015.

Após o teste de centrifugação observou-se que as formulações Tabela 14, com EHL 9 a 15, respectivamente, resultaram aparência emulsionada e estáveis, no entanto a formulação F-1, com EHL 8 resultou em aparência diferente, conforme Figura 21.

Tabela 14 – Formulações/EHL, Tamanho, IPD e Potencial Zeta.

Formulação	EHL	Tamanho (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
F-1	8	97,69	0,255	-26,7
F-2	9	81,55	0,177	-19,8
F-3	10	64,45	0,157	-15,3
F-4	11	69,71	0,108	-10,3
F-5	12	93,55	0,082	-7,88
F-6	13	154,3	0,085	-9,99
F-7	14	197,4	0,253	-7,07
F-8	15	152,5	0,292	-5,14

Fonte: C. A. L. Souza

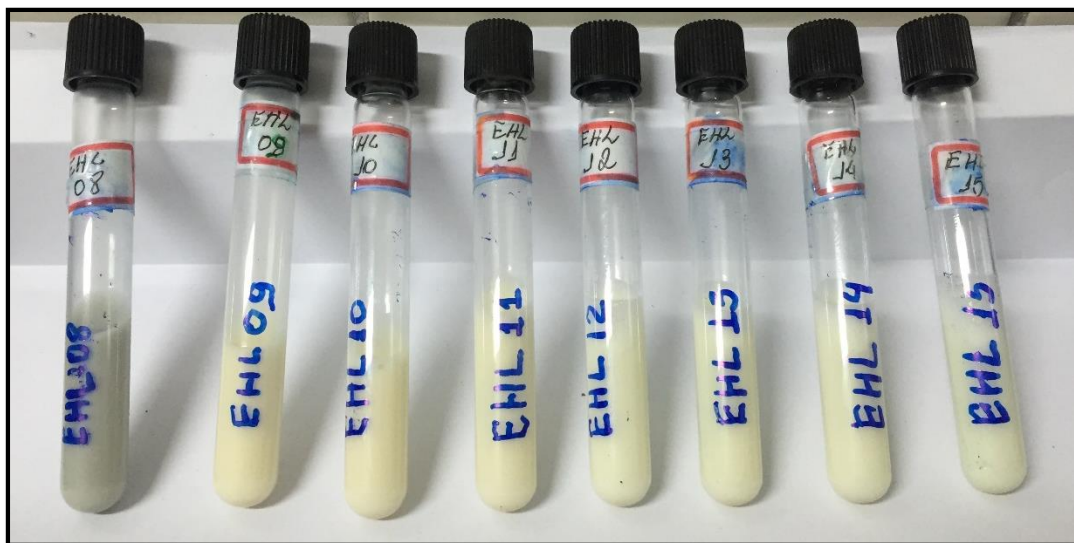


Figura 21 – Aparência dos sistemas emulsionados com EHL de 8 a 15
Fotos: C. A. L. Souza.

No que se refere aos resultados obtidos após a submissão das formulações F-1 a F-8 ao ensaio de *ZetaSizer*, os sistemas emulsionados produzidos com o OECHVG apresentaram resultados conforme demonstrados na Tabela 14, com tamanho de partículas entre 50 e 200 nm, sendo considerados, sistemas nanoemulsionados em todas as formulações F-1 a F-8. A formulação F-3 com EHL 10 apresentou os menores tamanhos de partículas, com 64,45 nm.

O resultado do índice de polidispersividade (IPD) das formulações F-1 a F-8 foi entre 0,080 e 0,300, observando-se que a de menor índice, foi obtida com EHL 12 (F-5).

E, as formulações apresentaram como resultado em relação aos valores, em módulo, do potencial Zeta entre 5,00 e 27,0 mV. A formulação com maior módulo de potencial Zeta, cuja tendência é que as partículas estejam dispersas de forma mais uniforme foi a F-1, com EHL 8.

Deve-se observar os valores do tamanho das partículas obtidas pelo índice de polidispersividade (IPD) e, em módulo, do Potencial *Zeta* (mV), sendo que, quanto mais baixo o valor do índice de polidispersividade menor a velocidade de desestabilização do sistema (alta estabilidade); e, quanto mais alto o valor, em módulo, do potencial *Zeta*, maior a uniformidade de dispersão das partículas. Portanto, considerou-se, para análise dos resultados que o sistema é nanoemulsionado com partículas de tamanho entre 20 e 200 nm (COSTA, 2015; HERNÁNDEZ, 2004; HIGUCHI *et al.*, 1962; KATSUMOTO *et al.*, 2000).

Outros estudos que corroboraram para esta afirmação foram a sintetização da *Cinnamomum zeylanicum* em nanoemulsões que ocorreu de forma satisfatória resultando partículas nanométricas, especificamente para a produção de nanobiocompósitos biodegradáveis para aplicação em embalagens ativas (MOURA *et al.*, 2014).

Em mais um estudo, a mesma espécie da canela acima referida (*Cinnamomum zeylanicum*) gerou nanoemulsões com aparência leitosa e gotículas variando de 120 a 230 nm, mantendo estabilidade por 72 horas, sem separação de fases (PONTES, 2013).

A estabilidade do sistema nanoemulsionado foi realizada de forma visual após 24h de aplicado o teste de centrifugação. As formulações mantiveram sua estabilidade conforme determinado por análise macroscópica.

Em uma análise comparativa, considerando a relação entre todos os resultados obtidos para cada formulação (índice de polidispersividade e potencial *Zeta*), pode-se considerar que as melhores nanoemulsões foram obtidas com EHL 9, 10, 11 e 12 (F-2 a F-5, respectivamente).

4.12 AVALIAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

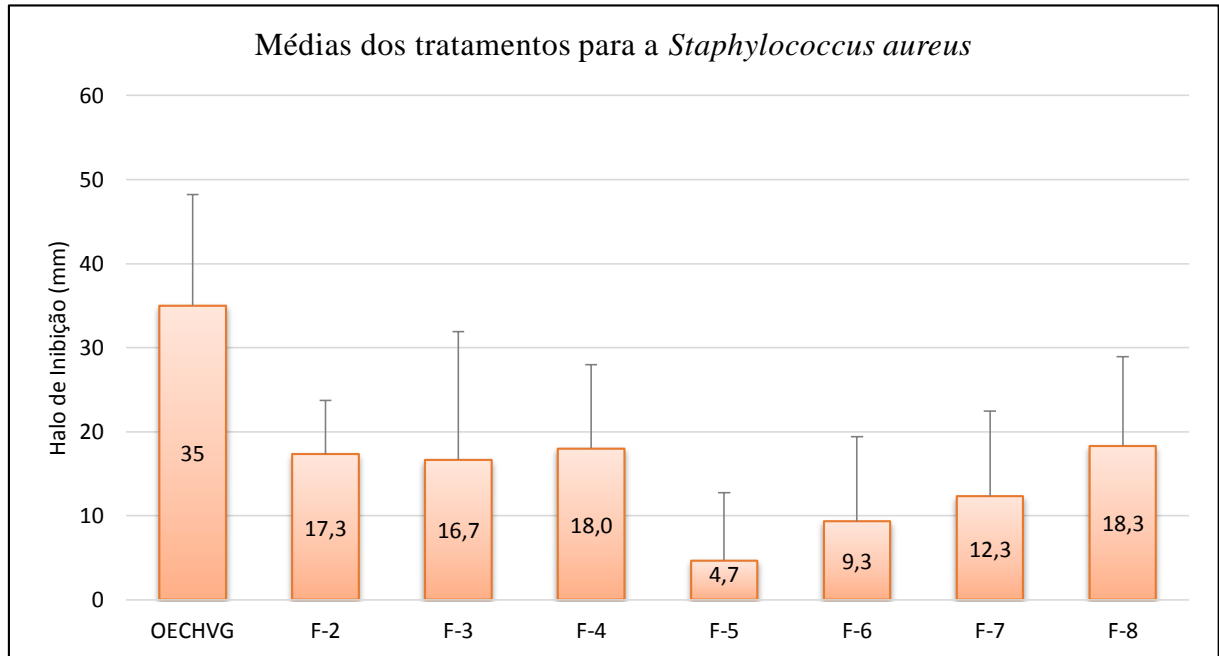
Em relação às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* o OECHVG, bem como os sistemas nanoemulsionados foram testados (teste de sensibilidade por difusão em disco no meio ágar Müeller-Hinton), sendo esta a técnica mais utilizado a na avaliação antimicrobiana de óleos essenciais (ANDRADE, 2010).

Para a bactéria *Staphylococcus aureus* na Tabela 15 são apresentados os resultados dos valores do diâmetro dos halos de inibição, bem como sua média e respectivo desvio padrão, dos quais gerou-se o Gráfico 38.

Tabela 15 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da *Staphylococcus aureus*

	OE	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8
Halo de inibição (mm)	25	10	0	8	0	8	7	7
	50	22	30	28	0	0	24	20
	30	20	20	18	14	20	6	28
Média	35	17,3	16,7	18,0	4,7	9,3	12,3	18,3
Desvio padrão	13,2	6,4	15,3	10,0	8,1	10,1	10,1	10,6

Fonte: C. A. L. Souza

**Gráfico 38** – Médias dos tratamentos para a *Staphylococcus aureus*.

Utilizando como tamanho de halo significativo para inibição da bactéria o valor igual ou superior a 10 mm (TRAJANO *et al.*, 2009) os resultados foram positivos em relação às formulações F-2, F-3, F-4, F-7 e F-8.

O OECHVG apresentou halo de inibição 2,5 vezes maior do que a média dos halos das nanoemulsões (F-2 a F-8), é provável que esta ocorrência se deve ao fato de as nanoemulsões terem sido produzidas com apenas 5 % de OECHVG. Pode-se ainda inferir que seja necessário aumentar a quantidade de OE nas nanoemulsões na mesma proporção para aumento do halo de inibição dos sistemas emulsionados contra a *Staphylococcus aureus*.

Apesar de o tamanho do halo ser bastante significativo, também na atuação do OECHVG, não se pode considerá-lo relevante, devido ao desvio padrão apresentado tornar o resultado não confiável estatisticamente.

Com a finalidade de comparar a diferença de tratamentos entre o OECHVG e as formulações testadas foi realizado o Teste de Tukey (Tabela 16).

Tabela 16 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a *Staphylococcus aureus*

Tratamento	Médias	Diferença Mínima Significativa (DMS)
OECHVG	35,0a	
F-2	17,3a	
F-3	16,6a	
F-4	18,0a	
F-5	4,6a	30,51
F-6	9,3a	
F-7	12,3a	
F-8	18,3a	

Fonte: C. A. L. Souza

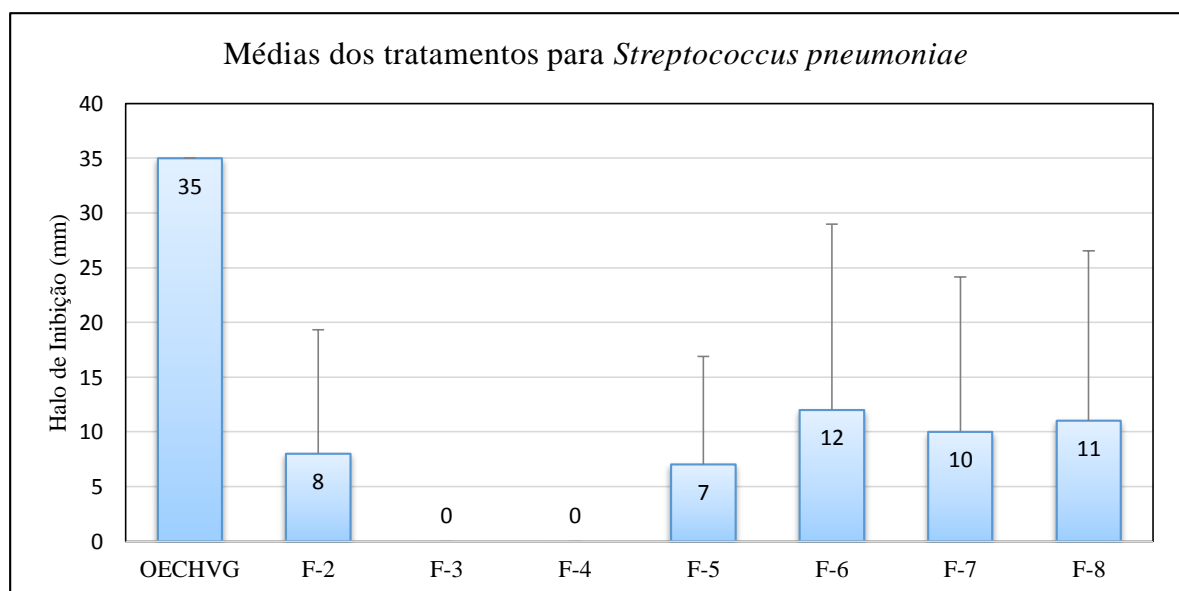
Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade obtendo-se como resultado que as médias não diferem estatisticamente entre si, uma vez que seguidas pela mesma letra.

No que se refere aos resultados obtidos no teste com a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, na Tabela 17 são apresentados os resultados dos valores do diâmetro dos halos de inibição, bem como sua média e respectivo desvio padrão, dos quais gerou-se o Gráfico 39.

Tabela 17 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da *Streptococcus pneumoniae*

	OE	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8
Halo de Inibição (mm)	35	16	0	0	14	24	20	22
	35	0	0	0	0	0	0	0
Média	35	8	0	0	7	12	10	11
Desvio padrão	0	11,3	0,0	0,0	9,9	17,0	14,1	15,6

Fonte: C. A. L. Souza

**Gráfico 39** – Médias dos tratamentos para a *Streptococcus pneumoniae*.

Em relação à atuação do sistema nanoemulsionado contra a bactéria *Streptococcus pneumoniae* somente as formulações F-6, F-7 e F-8 obtiveram resultados positivos, tendo como base o tamanho mínimo de halo de 10 mm.

Já a atuação do OECHVG contra essa bactéria deve ser levado em consideração, pois o halo de inibição é significativamente elevado, com nenhum desvio padrão, o que demonstra a confiabilidade do resultado.

Comparando a diferença de tratamentos entre o OECHVG e as formulações testadas, o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi realizado, obtendo-se como resultado que as médias não diferem estatisticamente entre si (Tabela 18):

Tabela 18 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a *Streptococcus pneumoniae*

Tratamento	Médias	Diferença Mínima Significativa (DMS)
OECHVG	35,0a	
F-2	8,0a	
F-3	0,0a	
F-4	0,0a	
F-5	7,0a	43,28
F-6	12,0a	
F-7	10,0a	
F-8	11,0a	

Fonte: C. A. L. Souza

Os resultados apresentados pelo OECHVG e nanoemulsões no teste microbiológico com a bactéria *Escherichia coli* estão mostrados na Tabela 19 com os valores do diâmetro dos halos de inibição, bem como sua média e respectivo desvio padrão, desses dados gerou-se o Gráfico 40.

Tabela 19 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da *Escherichia coli*

	OE	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8
Halo de inibição (mm)	28	14	16	13	13	14	10	14
	31	20	24	20	22	16	16	18
	30	17	24	14	20	19	14	17
Média	29,7	17,0	21,3	15,7	18,3	16,3	13,3	16,3
Desvio padrão	1,5	3,0	4,6	3,8	4,7	2,5	3,1	2,1

Fonte: C. A. L. Souza

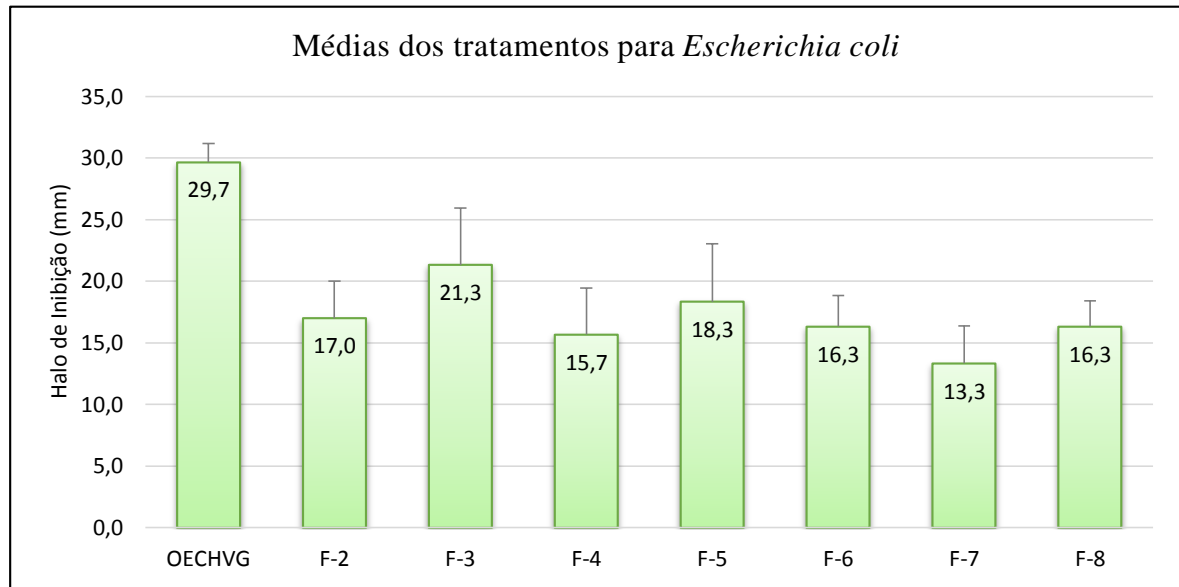


Gráfico 40 – Médias dos tratamentos para a *Escherichia coli*.

A média do halo de inibição tanto do OECHVG como das nanoemulsões testadas apresentaram resultado positivo, com valores superiores a 10 mm. Tendo em vista que os desvios padrão determinados foram baixos, os resultados da *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil contra a *Escherichia coli* podem ser considerados confiáveis e relevantes para estudos de aplicação efetiva.

A partir da realização do Teste de Tukey ao nível de 5 %, para verificar se existe diferença de tratamento entre o OECHVG e as nanoemulsões, foi constatado diferença de tratamento entre a utilização do OE e das nanoemulsões (Tabela 20).

Tabela 20 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a *Escherichia coli*

Tratamento	Médias	Diferença Mínima Significativa (DMS)
OECHVG	29,6a	
F-2	17,0b	
F-3	21,3ab	
F-4	15,6b	
F-5	18,3b	9,45
F-6	16,3b	
F-7	13,3b	
F-8	16,3b	

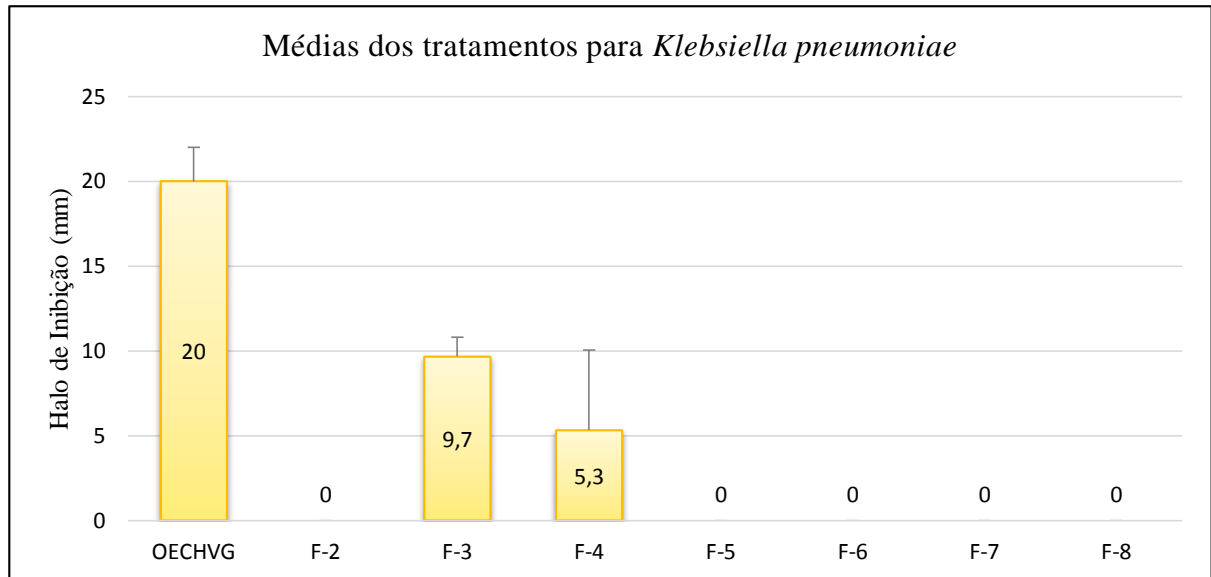
Fonte: C. A. L. Souza

A atividade antibacteriana do OECHVG e das nanoemulsões testadas contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* apresentou valores do diâmetro dos halos de inibição, bem como sua média e respectivo desvio padrão conforme Tabela 21 e Gráfico 41.

Tabela 21 – Resultado microbiológico de disco de fusão para o tratamento da *Klebsiella pneumoniae*

	OE	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8
Halo de Inibição (mm)	20	0	9	0	0	0	0	0
	18	0	9	9	0	0	0	0
	22	0	11	7	0	0	0	0
Média	20	0	9,7	5,3	0	0	0	0
Desvio Padrão	2	0	1,2	4,7	0	0	0	0

Fonte: C. A. L. Souza

**Gráfico 41** – Médias dos tratamentos para a *Klebsiella pneumoniae*.

A média do halo de inibição do OECHVG é significativa uma vez que possui um baixo desvio padrão, no entanto, nenhuma das nanoemulsões tiveram resultado positivo, pois os halos de inibição foram menores que 10 mm contra a *Klebsiella pneumoniae*.

Quanto à existência de diferença de tratamento entre o OECHVG e as nanoemulsões analisadas por meio do Teste de Tukey, existe diferença (Tabela 22), no entanto, considerando que o halo das nanoemulsões não tiveram resultados inibitórios, pois inferior a 10 mm, verifica-se com possibilidade de tratamento apenas o OECHVG.

Tabela 22 – Teste Tukey realizado para tratamento frente a *Klebsiella pneumoniae*

Tratamento	Médias	Diferença Mínima Significativa (DMS)
OECHVG	20,0a	
F-2	0,0c	
F-3	9,6b	
F-4	5,3b	
F-5	0,0c	5,26
F-6	0,0c	
F-7	0,0c	
F-8	0,0c	

Fonte: C. A. L. Souza

Ressalta-se que para a análise dos resultados foi considerado o valor de F o resultado da comparação de variância que, para ser considerado significativo deve ser maior que o F-Crítico, que é o limite.

Analizou-se, ainda a probabilidade de os tratamentos com o OECHVG e com as nanoemulsões serem iguais (“p”), sendo que, se $p < 0,01$ considera-se significativa a diferença de tratamento ao nível de 1 % de probabilidade; se $0,01 \leq p < 0,05$ considera-se significativa a diferença de tratamento ao nível de 5 % de probabilidade; e, se $p \geq 0,05$ a diferença de tratamento não é significativa.

A Tabela 23 demonstra os resultados estatísticos referentes à diferença de tratamento entre o OECHVG e as nanoemulsões, considerando as variáveis de F, F-Crítico, p (índice de probabilidade) e coeficiente de variância (CV) para cada bactéria testada.

Tabela 23 – Probabilidade estatística de diferença de tratamento com o uso do OECHVG e das nanoemulsões

Bactérias	F-Crítico	Teste F	Índice de Probabilidade de (p)	Coefficiente de Variância (CV%)	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,6572	2,0524	0,1107	65,55	Não houve diferença estatísticas nos tratamentos entre as amostras
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3,5005	2,0129	0,1738	105,36	Não houve diferença estatísticas nos tratamentos entre as amostras
<i>Escherichia coli</i>	4,0259	6,8742	0,0006	18,06	Significativo ao nível de 1% de probabilidade
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,0259	45,6988	0,0001	42,51	Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Fonte: C. A. L. Souza

Na literatura encontrou-se o estudo do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera* e *Escherichia coli*. A sensibilidade das bactérias à ação do OE foi verificada com base no tamanho do halo de inibição formado, onde halo com diâmetro inferior a 8 mm resulta que a bactéria é resistente ao produto

e halo com diâmetro entre 9 e 14 mm indicam a sensibilidade da bactéria. O referido estudo resultou que o óleo essencial da canela apresentou inibição de 15 mm contra todas cepas testadas (DIAS, 2009).

Comparando o resultado acima com os obtidos nesta pesquisa observa-se que o OECHVG apresentou média no diâmetro dos halos de inibição de 35, 35, 29,7 e 20 mm contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* respectivamente, o que traduz melhor atividade do que a espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para atividade antimicrobiana.

O óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* também obteve resultados positivos em testes contra fungos, especificamente *Septoria lycopersici*, *Stemphylium solani* e *Alternari solani*, chegando a uma inibição de 98,47 % contra este último (TOMAZONI *et al.*, 2013). A partir desse resultado, pode-se indicar que a submissão do OECHVG também possa ser positivo para esse tipo de microrganismo.

No que se refere às nanoemulsões os valores obtidos, aliado ao desvio padrão considerados nos testes, que os tornou inconclusivos em alguns casos, instiga a realização de testes posteriores com variadas concentrações de OECHVG. Além disso, a fim de confirmar os dados obtidos demanda-se a novas análises com métodos de maior sensibilidade.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a finalidade de caracterizar a composição química da planta *Cinnamomum hatschbachii* Vattimo-Gil (Canela) foi extraído seu óleo essencial (OECHVG) pelo método da hidrodestilação a partir de suas folhas, obtendo-se um óleo essencial transparente de cor amarelada. Em relação ao OECHVG também foi obtido o valor médio do índice de refração de 1,5769 a 27,6 °C, densidade média de 1,0230 g.ml⁻¹ e o rendimento de 0,71 %, valor compatível com a média dos rendimentos de outras espécies de canela encontrados na literatura.

Foi obtido, também, o valor médio do potencial hidrogeniônico (pH) do OECHVG de 5,89, caracterizando-o como ácido compatível com o pH da pele humana, o que induz a realização de trabalhos para a produção de produtos de uso tópico sem agressões à pele humana.

Para a obtenção do cromatograma do OECHVG, na intenção de identificar seus compostos, foram testados dois solventes e uma mistura dos dois (clorofórmio, etanol e clorofórmio/etanol) em concentrações de 0,2 e 2 %, no entanto, somente a amostra com clorofórmio a 2 % mostrou dados consistentes para a análise. Podendo-se concluir que o OECHVG é compatível com solvente apolar (clorofórmio).

Da análise dos resultados, dos 100% dos picos obtidos no CG-EM, identificou-se 86,27 % do OECHVG, que é formado por uma mistura de compostos químicos pertencentes aos grupos funcionais aldeído aromático, éster, hidrocarboneto aromático e monoterpeneo, dos quais 44,87 % são aldeídos aromáticos, tais como: 3-fenil-2-propenal (36,69 %), 3-fenil-propanal (3,33%), Cinamaldeído (3,13%) e Benzaldeído (1,72%); 34 % são ésteres, tais como o Acetato de 2-fenil-propila (20,60%) e o Benzoato de benzila (13,40%); 5,13 % são monoterpeneos, quais sejam: *p*-isopropil-tolueno (1,93%), α -pineno (1,12%), Linalol (0,77%), α -terpineol (0,72%) e Canfeno (0,59%); e 2,26 % são hidrocarbonetos aromáticos representados pelo 3-fenil-propeno (2,26%).

Três compostos mereceram destaque pela sua abundância no OECHVG, o 3-fenil-2-propenal, acetato de 2-fenil-propila e benzoato de benzila, que por possuírem propriedades aromatizante, antibacteriana e antifúngica e representarem 70,69 % da composição do OE, permite concluir que tais propriedades também estão presentes no OECHVG.

Vale mencionar que 13,73 % do OECHVG não foi identificado na comparação dos espectros de massa obtidos com a base de dados da NIST, concluindo-se por possibilidades de novos estudos, pois podem até mesmo representar compostos não conhecidos.

O método da ultrassonicação demonstrou-se eficiente para a produção de nanoemulsões e o OECHVG também é compatível para a obtenção desses sistemas, pois as partículas obtidas atingiram tamanhos entre 64,45 e 197,4 nm.

O OECHVG teve atividade significativa contra toda as bactérias testadas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Obteve-se um halo de inibição de 35 mm contra *Staphylococcus aureus*, de 35 mm contra a *Streptococcus pneumoniae*, de 29,7 mm contra a *Escherichia coli* e de 20 mm contra a *Klebsiella pneumoniae*, todos superiores ao halo mínimo adotado de 10 mm.

Comparando a atividade do OECHVG com o OE de outra espécie de *Cinnamomum* pode-se concluir que o OECHVG apresentou melhor atividade do que a espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. Além disso, a partir de estudos existentes de outras espécies a conclui-se que existe boas perspectivas de aprofundamento nos estudos do OECHVG também contra outros microrganismos como os fungos, tal possibilidade se confirma, também, pelas propriedades de seus componentes majoritários.

Já as nanoemulsões testadas apresentaram valores insatisfatórios contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae*, no entanto, considerando a boa atividade do OECHVG conclui-se como necessária a realização de novos estudos com nanoemulsões produzidas com maiores concentrações do OECHVG. Em relação à bactéria *Escherichia coli* os resultados da atuação das nanoemulsões foram melhores com halos de inibição acima do mínimo e desvio padrão baixo. Vale destacar que contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* nenhuma formulação de nanoemulsão teve atividade (halos de 0 a 9,7 mm) considerando o halo de inibição padrão (10 mm).

Para melhor desenvolvimento de estudos com os dados obtidos da caracterização físico-química do OECHVG recomenda-se ainda a realização de testes relacionados a sua toxicidade, capacidade antioxidante em alimentos

Por fim, relacionando a constatação da compatibilidade do pH do OECHVG com o da pele, com a boa atividade do OECHVG frente às bactérias testadas, conclui-se por boas perspectivas para a produção de produtos para combate e tratamento de infecções cutâneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, S.; HAYAT, K.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; ZHANG, X. An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 139-157, 2013.
- ALLARDICE, P.; BONE, K.; HUTCHISON, F. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. 1. ed. Rio de Janeiro: READER'S DIGEST LV, 1999. 416p.
- ALVES, M. D. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Allelopathy of plant volatile extracts on seed germination and radicle length of lettuce. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- AMAZONAS, D. R. **Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora ducke*) do oeste do Pará**. 2012. 71 p. Dissertação (Mestre em Recursos Naturais da Amazônia). Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém-PA, 2012.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2010.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. D. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência e Agronomia**, v. 43(2), p. 399-408, 2012.
- ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas Medicinais: Cultura Popular versus Ciência. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, p. 51-60, 2011.
- ASSIS, L. M. D.; ZAVAREZE, E. D. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. D. Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- ATOCHE, J. J. M. **Caracterização físico-química, espectroscópica e estudo da atividade antinociceptiva do óleo essencial de Croton Cajucara BENTH**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Acre, Rio Branco.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; JÚNIOR, A. F.; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 43, n. 4, p. DOI: 10.1590/S1983-40632013000400006, 2013.

BONA, T. D. M. M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L. B.; KURITZA, L. N.; VASCONCELOS, S. P.; SANTIN, E. Óleo Essencial de Orégano, Elecrim, Canela e Extrato de Pimenta no Controle de Salmonella, Eimeria e Clostridium em Frangos de Corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32(5), p. 411-418, 2012.

BRASIL. **Decreto no 55871 de 26 de Março de 1965**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília: Presidência da República - Casa Civil: Subchefia para Assuntos Jurídicos: 5 p. 1965.

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

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), p. Vigilância Sanitária, 2015a. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia> >. Acesso em: 26/05/2015.

_____. Fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2015b. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf >. Acesso em: 01/05/2015.

BRASIL, F. I. Microorganismos Causadores de Doenças de Origem Alimentar. **Revista Food Ingredients Brasil**, 2009.

BUDRI, P. E. **Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum zeylanicum* e seus compostos majoritários na produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite subclínica**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado Biologia Geral e Aplicada). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2014.

CANELA, B. D. Benefícios da Canela. **jpg**, 2011. Disponível em: < <http://www.beneficiosdacanela.com/> >. Acesso em: 01/03/2015.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, A.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(2), p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. M. P. **Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho: plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal**. 2005. 475 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2005.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Ceres, 2005. 650 p.

CLSI. **Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**. 8^a. Pensilvânia, Estados Unidos da América: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. 58 p.

COSTA, A. O. D. **Óleo essencial de *Lantana camara* linn: caracterização, desenvolvimento de nanoemulsão e atividade antileishmania**. 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC, 2015.

DIAS, V. L. N. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo**. 2009. 115 p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2009.

DOURADO, M. T. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas**. 2012. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2012.

DUARTE, R. C. **Estudo dos Compostos Bioativos em Especiarias (*Syzygium aromaticum* L, *Cinnamomum zeilanicum* Blume e *Myristica fragans* Houtt) Processadas por Radiação Ionizante**. 2014. 145 p. Tese (Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, 2014.

DURAN, N.; MORAIS, P. C. D.; MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006. 208 p.

DURANT, W.; PEREA, F. J. **Historia de la Filosofía**. Mexico: Diana, 1978.

FANG, J.-M.; CHEN, S.-A.; CHENG, Y.-S. Quantitative analysis of the essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 744-746, 1989.

FARIA, F. S. E. D. V. **Secagem Convectiva de Sacaca (*Croton cajucara* Benth): Análise Experimental da Influência de Variáveis de Entrada no Rendimento em Óleo Essencial, Umidade Final e Teor de Linalol**. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2010.

FERREIRA, S. G. **Sistemas nanoestruturados obtidos a partir de óleo essencial de *Citrus sinensis*/água estabilizados por tensoativo: Avaliação estrutural e potencial uso no controle larvicida do *Aedes aegypti***. 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão-SE, 2014.

FILIPPIS, F. M. D. **Extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho: experimentos e modelagem**. 2001. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z. G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2690-2694, 1997.

FREIRE, J. M.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; ANDRADE, M. A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, 2011.

GENDE, L. B.; FLORIS, I.; FRITZ, R.; EGUARAS, M. J. Antimicrobial activity of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. **Bulletin of insectology**, v. 61, n. 1, p. 1, 2008.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by "HLB". **J Soc Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1946.

GUERRA, A. M. N. D. M.; DA CUNHA NETO, J. R.; MARQUES, J. V. D. A. D.; DE FREITAS PESSOA, M.; MARACAJÁ, P. B. Plantas medicinais e hortaliças usadas para cura de doenças em residências da cidade de Mossoró-RN. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 2, n. 1, p. 70-77, 2007.

HAWKING, S. **Uma breve história do tempo**. Rio de Janeiro: Editora Intrínseca, 1988. 580 p.

HEIDE, R. T. Qualitative analysis of the essential oil of cassia (*Cinnamomum cassia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 747-751, 1972.

HELLMUTH, R. D. A. P. **Modelo de alvéolo pulmonar incluindo efeitos de tensão superficial**. 2006. 72 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Mecânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HERNÁNDEZ, C. **Formación de nanoemulsiones o/w mediante el cambio en la composición-formulación por dilución con agua de sistemas próximos a la formulación óptima**. 2004. 99 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química). Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, Mérida, 2004.

HIGUCHI, W.; MISRA, J. Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 51, n. 5, p. 459-466, 1962.

IPEK, E.; ZEYTINOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B. A.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K. H. C. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 551-556, 2005.

JOAQUIN, C.; PLÉVERT, L. **Nanociências: a revolução do invisível**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2009. 164 p.

JUNIOR, V. F. D. V. Estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais da saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KATSUMOTO, Y.; USHIKI, H.; MENDIBOURE, B.; GRACIAA, A.; LACHAISE, J. Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: II. Growth mechanism of miniemulsion droplets. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 12, n. 15, p. 3569–3583, 2000.

KENTISH, S.; WOOSTER, T.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KIM, H.-O.; PARK, S.-W.; PARK, H.-D. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2004.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. D. O.; LOPES, D.; MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. 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. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

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

LIMA, M. D. P.; ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **ACTA AMAZONICA**, v. 35(3), p. 363-366, 2005.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUTZ, A. Procedimentos e Determinações Gerais. In: (Ed.). **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos para análise de alimentos**. São Paulo, v.3, 1985. cap. IV, p.83-160.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família *Lauraceae* Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARTÍNEZ, A. Aceites esenciales. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 1, p. 77-79, 1996.

MARTINS, J. N.; SANTOS, D. D. C.; ALEXANDRINO, S. P. D. S.; OLIVEIRA, E. N. A. D.; CASTELLÓN, R. E. R. Obtenção e caracterização físico-química do extrato oleoso de alho roxo (*Allium sativum*). **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 4, n. 3, p. 01-04, 2010.

MCINTYRE, A. **The Complete Herbal Tutor: The ideal companion for study and practice** New York: 2010. 256 p.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. São Paulo: International Thomson Editores, 2014. 1124 p.

MELO, J. A. S. D. **Inovação tecnológica: O uso direto de óleos vegetais como vetor energético no Brasil**. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável). Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília (UNB), Brasília, 2009.

MENDES, L. S. D. S. **Estudo Químico e Atividade Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essência das Folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (CANELA)**. 2011. 71 p. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2011.

MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos**. 2010. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

MONTEIRO, I. N. **Composição química e avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial da *Cinnomum zeylanicum* no controle de *Rhipicephalus microplus***. 2013. 64 p. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MOREIRA, T. C. **Caracterização físico – química, espectroscópica, cromatográfica, avaliação das atividades biológicas, microbiológicas e obtenção de nanoemulsão do óleo essencial das folhas de *Copaifera multijuga* hayne**. 2015. 79 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC, 2015.

MOURA, M. R. D.; AOUADA, F. A.; SOUZA, J. R.; MATTOSO, L. H. C. Preparação de Novos Nanobiocompósitos Comestíveis Ativos Contendo Nanoemulsão de Canela e Pectina. **Polímeros**, v. 24, n. 4, p. 486-490, 2014.

NIST. **National Institute of Standards and Technology (NIST)**. on line: U.S. Department of Commerce 2010.

OLIVEIRA, A. G. D.; 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, C. M.; SPITZER, S. V. Óleos Voláteis. In: UFRGS, E. D. (Ed.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Florianópolis, 2000. cap. 18, p.467-495.

OLIVEIRA, R. D. Nota sobre a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase-KPC. on line, 2011. Disponível em: < http://www.saude.mt.gov.br/upload/controle-infeccoes/pasta3/nota_estadual_sobre_klebsiella_pneumoniae_produtores_de_carbapenemas_kpc.pdf >. Acesso em: 07/10/2015.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-30, 2010.

PHILIPPI, J. M. D. S.; MORETTO, E. Salmonella and fecal coliforms in cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume and *Cinnamomum zeylanicum* Nees) sold in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 4, p. 624-628, 1995.

PHUTDHAWONG, W.; KAWAREE, R.; SANJAIYA, S.; SENGPRACHA, W.; BUDDHASUKH, D. Microwave-assisted isolation of essential oil of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Bl.: comparison with conventional hydrodistillation. **Molecules**, v. 12, n. 4, p. 868-877, 2007.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POLETTO, F. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. **Uma Pequena Grande Revolução. Ciência Hoje**. <http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch>: Ciência Hoje. 43: 26-31 p. 2008.

PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos**. 2013. 129 p. Tese (Doutor em Ciências). Departamento em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C.; PRETSCH, E.; BHUHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 433 p.

PROBST, I. D. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 Dissertação (Mestre em Biociências - Estrutura e Função). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et LM Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 208-211, 2002.

REIS, J. B. **Estudo Analítico, Avaliação de Toxicidade e Atividade Moluscicida do Óleo Essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume (CANELA) Frente ao Caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. 2012. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exata e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2012.

RHODES, M. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.

RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm**, v. 45, n. 1, p. 52-9, 1995.

ROJAS, H. A.; MARTÍNEZ, J. J.; VARGAS, L.; ALVARADO, M. I.; BORDA, G. Cinnamaldehyde hydrogenation over Au/ZrO₂ and Au/ZrO₂-SiO₂ catalysts. Support effect and preparation method. **Ingeniería y competitividad**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2012.

SALAGER, J.-L.; MARQUEZ, L.; FORGIARINI, A. **Nanoemulsions**. Univerdad de Los Andes. Mérida. 2006

SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G. A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.-Y.; DASHWOOD, R. H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 495, n. 1, p. 61-74, 2001.

SANTOS, A.; ALVES, S. D. M.; FIGUEIREDO, F.; DA ROCHA NETO, O. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Embrapa Amazônia Oriental. 2004

SANTOS, R. I. D. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: UFRGS, E. D. (Ed.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6^a ed. Florianópolis, 2004. cap. 16, p.403-434.

SANTOS, S. O.; ALVES, M. Sinopse taxonômica da família *Lauraceae* na porção norte da Floresta Atlântica brasileira. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 14-28, 2013.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SENHAJI, O.; FAID, M.; KALALOU, I. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 234-236, 2007.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A.; SOUZA, M. D.; HENRIQUES, M.; RAMOS, M. D. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SICHERI, A. P. M. P. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP, 2013.

SILVA, É. A. S. **Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium* spp.** 2006. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2006.

SILVA, G. M. D. Escabiose Humana novas perspectivas sobre seu tratamento. **Revista UNIPLAC**, v. 1, n. 1, 2014a.

SILVA, J. M. H. Evaluación de la acción bactericida de aldehído cinámico y aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) en emulsión. 2014b.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2013. 506 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010. 1102 p.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 145-149, 2004.

SOUZA, J. C. D. **Os pensadores pré-socráticos: fragmentos, doxologia e comentários.** São Paulo: Editora Nova Cultura, 2000. 353 p.

TEIXEIRA, J. M. A Medicina em Historia: A Medicina Egípcia. **Revista Leitura**, v. III, n. 3, p. 51-54, 2001.

TOMAZONI, E. Z.; GIANI, S. G.; DA SILVA RIBEIRO, R. T.; PAULETTI, G. F.; SCHWAMBACH, J. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo Sobre o Uso de Plantas Medicinais em Crianças Hospitalizadas da Cidade de João Pessoa - Riscos e Benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. D.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, v. 5, n. 9, p. 89-96, 2013.

TYRRELL, M. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technology (USA)**, v. 44, n. 1, p. 68-72, 1990.

UNLU, M.; ERGENE, E.; UNLU, G. V.; ZEYTIÑOGLU, H. S.; VURAL, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3274-3280, 2010.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: PR, A. (Ed.). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Germany, v.4, 1987. cap. 2, p.17-42.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. **ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA**

LAURACEAE. 2011. 161 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2011.

ZLOTOGORSKI, A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Archives of dermatological research**, v. 279, n. 6, p. 398-401, 1987.