



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE

**PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
EM MEDICAMENTOS**

ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESPUMA DENTAL, CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO
DE LESÕES BUCAIS.**

**JOÃO PESSOA - PB
2019**

ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESPUMA DENTAL, CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO
DE LESÕES BUCAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Desenvolvimento de produtos e processos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

COORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

**JOÃO PESSOA - PB
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237d Santos, Alessandra Estevam Dos.
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESPUMA DENTAL, CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO
E TRATAMENTO DE LESÕES BUCAIS. / Alessandra Estevam Dos
Santos. - João Pessoa, 2019.
228 f.

Orientação: FÁBIO CORREIA SAMPAIO.
Coorientação: FÁBIO SANTOS DE SOUZA.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. LIPPIA SIDOIDES CHAM. 2. LESÕES DA CAVIDADE BUCAL.
3. ÓLEO ESSENCIAL. 4. ESPUMA DENTAL. I. SAMPAIO, FÁBIO
CORREIA. II. SOUZA, FÁBIO SANTOS DE. III. Título.

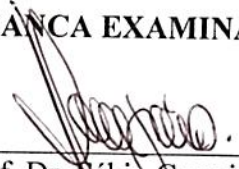
UFPB/BC

Alessandra Estevam dos Santos

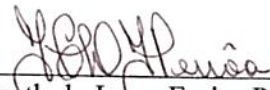
**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ESPUMA DENTAL, CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO
DE LESÕES BUCAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em
Medicamentos como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos. Área de
concentração: Desenvolvimento de produtos e
processos.

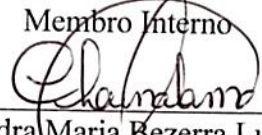
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Orientador



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa – UFPB
Membro Interno



Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima – UFPB
Membro Interno

Profa. Dra. Elisana Afonso de Moura Pires – FACENE
Membro Externo

Prof. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros – UFCG
Membro Externo

João Pessoa, 22 de abril de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PARAÍBA

REITOR

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

VICE-REITOR

Profa. Dra. Bernardina Maria Juvenal Freire De Oliveira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. João Euclides Braga

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

Profa. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá

Aos meus amados pais Edna e José Clementino (*in
memorian*), meus irmãos Patrícia e Clemensen, ao
meu esposo Danyel e meu amado filho Henrique por
toda dedicação, compreensão e amor incondicional.

Vocês são meu porto seguro e meu incentivo para
buscar a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades a mim oferecidas e por sempre estar ao meu lado me guiando, me mostrando tudo o que posso conquistar e me dando força e sabedoria para enfrentar os desafios da vida. “Tudo é do Pai, toda honra e toda a glória, é Dele a vitória alcançada em minha vida.”

A Nossa Senhora, mãe e rainha, por sua luz e intercessão em minha vida.

Ao meu pai José Clementino (*in memorian*) pelos sentimentos que trago em meu coração e pela certeza que estaria orgulhoso e feliz por esta conquista. A minha mãe Edna, pelo amor incondicional demonstrado a todo momento, pelo exemplo que é para mim, por toda ajuda e oração. Obrigada por acreditarem sempre em mim. Amo vocês.

Aos meus irmãos Patrícia e Clemensen pelo carinho e incentivo, pelos conselhos e por tantas vezes que apenas me ouviram e fizeram me sentir amada. Amo vocês.

Ao meu esposo e grande companheiro Danyel por todo o incentivo, por acreditar que eu era capaz, por me apoiar em tudo que precisei com muito amor, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e por compartilhar a vida comigo. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Eu te amo.

Ao meu amado filho Henrique, presente de Deus em minha vida, seu sorriso me dá forças para seguir adiante e me incentiva a fazer sempre o meu melhor. Seu abraço será sempre o melhor lugar do mundo. Obrigada por ser luz em minha vida.

Aos meus amigos e familiares, por compreenderem a minha ausência em tantos momentos especiais e pela sincera torcida.

A Jéssica Karina, “a culpada” por me apresentar ao programa DITM e me fazer acreditar que essa conquista era possível.

Ao meu querido orientador Professor Dr Fábio Sampaio, minha eterna gratidão pelos ensinamentos, momentos compartilhados, pela paciência e por sempre acreditar em mim. Sua generosidade, tranquilidade, responsabilidade e sensibilidade em conduzir essa caminhada faz a diferença na vida de todos que tem a honra de ser orientado por você. Obrigada por me guiar nesta trajetória. Você é um ser humano ímpar e um profissional brilhante. Tenho grande admiração e carinho por você. Nossa parceria continua com certeza.

Ao meu coorientador Professor Dr Fábio Souza pela oportunidade, por todo aprendizado, pela compreensão e confiança no meu trabalho e por me incentivar sempre. Obrigada por me orientar e permitir o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi muito com o senhor e tive a oportunidade de conviver com uma pessoa de um coração enorme e de grandes qualidades. Te admiro muito.

Aos amigos do Labial, Allan, Jocianelle, Isabela, Isabel, Morgana, Karol e Carol Uchoa, pelo companheirismo, dedicação e momentos compartilhados.

A Isabella Barros, amiga que o Labial me deu, pelo companheirismo no laboratório, pelo incentivo mesmo quando as coisas não estavam bem, pelas coletas, pelos fins de semana em experimento e principalmente pela amizade sincera.

A Michelline Cavalcanti, pelo companheirismo, incentivo, exemplo de persistência e dedicação e pela amizade.

A Lília pela pessoa que você é. Você me faz continuar acreditando na bondade das pessoas. Obrigada por toda a ajuda e carinho.

A Patrícia Freitas por toda a ajuda, carinho e pela alegria contagiante.

A Alexandre, agradeço de coração pelo compromisso e responsabilidade com que me ajudou na formatação da tese e nos experimentos no Labial, pela disponibilidade, paciência e amizade.

Aos meninos do Pibic, Carlos, Glaudemir e Antônio pela vontade de aprender e pelo compromisso.

A Tainá e João pela parceria na realização da análise de ressonância magnética nuclear.

Aos amigos do Ludem, Fabrício, Valmir, Ertha, Glória, Renata, Agna, Deise, Fernando, João Paulo, Nathália e Lázaro pelo companheirismo e momentos compartilhados.

A Venâncio, pela paciência e compromisso com que me recebeu no laboratório, pelas horas de análises e pelas várias noites em experimento, pela responsabilidade e disponibilidade.

As amigas, Rayanne e Taynara pela imensa ajuda, disponibilidade e carinho. Vocês foram anjos na minha vida, quando eu mais precisei. Tenho certeza que vocês não têm noção do quanto foram importantes nossas conversas.

A Vanessa, por compartilhar tantos momentos no laboratório, por dividir as preocupações e me ouvir quando precisei, pelas noites inteiras em experimento, pelo carinho e pela amizade tão especial. Estarei sempre torcendo por você.

Ao professor Dr. Paulo Bonan pela gentileza e profissionalismo, pela grande ajuda ainda na elaboração do projeto e pelas importantes contribuições na banca de qualificação.

Ao engenheiro agrônomo Fernando Viana pela parceria e pelos cuidados com a planta.

Ao Sr. Francisco José pela responsabilidade e atenção com que cuidou da *Lippia* durante todo o período da pesquisa no Horto da UFPB.

A Nonato que muito admiro e por quem tenho muita estima e carinho. Obrigada pelas extrações do óleo e pelas ótimas conversas. Você é um grande exemplo.

A Horacina pela tranquilidade, responsabilidade e compromisso na realização do HET-CAM. Aprendi muito com você.

A Dra Bruna Braga Dantas, Dr Demetrius Antonio Machado de Araújo e Matheus Fabião de Lima pela parceria na realização dos testes de citotoxicidade.

A Raimundo pela colaboração com a elaboração das patentes.

A Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP) do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) pelo apoio ao projeto.

A Alisson, da estatística, por todo empenho e responsabilidade com minhas análises. Você me deu tanto trabalho quanto eu dei a você, mas no final ficou a amizade. Conte sempre comigo.

A Danilo, da informática, por me “salvar” sempre que precisei.

Aos colegas do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) pelo apoio e compreensão, em especial, Renata Moura. Sua paz de espírito e amizade verdadeira fazem a diferença no meu dia a dia.

Aos colegas do Complexo de Pediatria Arlinda Marques (CPAM) pelo incentivo e torcida.

A todos os colegas do curso de Doutorado, pela convivência, pela troca de experiências e pelos momentos compartilhados.

A Kardilândia Mendes e Luciana Ramalho pela parceria em todos os momentos, pelas disciplinas e viagens e pela amizade sincera.

Aos professores do Programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos pela dedicação e conhecimento compartilhado.

As professoras Dra. Caliandra Lima Luna, Dra. Elisana Afonso de Moura Pires, Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa e Dra. Francinalva Dantas de Medeiros pela participação na banca examinadora desta tese, e pelas contribuições depositadas neste trabalho.

A Fabiano Vilhena, da Oralls, pela parceria, pelos produtos fornecidos e por acreditar em nosso trabalho.

A Ana Paula Borges da Silva Lemos, farmacêutica da CLI Indústria de Cosméticos Ltda pela parceria na produção da espuma dental.

A Guaraves pelo fornecimento dos ovos para realização dos ensaios HET-CAM.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”

Eduardo Galeano

RESUMO

Introdução - As lesões ulcerativas na cavidade oral ocasionam dor e interferem na qualidade de vida do paciente. **Objetivo** - Avaliar *in vitro* o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., na perspectiva de desenvolver uma forma farmacêutica indicada para lesões na cavidade bucal. **Métodos** – O óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (OELS) foi extraído a partir das partes aéreas da planta e seu óleo foi caracterizado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM), sendo quantificado o componente majoritário, timol, através de um método desenvolvido e validado em Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-DIC). Foi realizado um estudo de sazonalidade para verificação do teor de timol e rendimento em relação às variáveis climáticas. A atividade antimicrobiana do OELS, dos óleos essenciais associados *Cymbopogon citratus* e *Citrus limon* e da espuma dental desenvolvida foi verificada frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* através de ensaios de difusão em ágar, microdiluição e *checkerboard* e a citotoxicidade dos óleos avaliada. Foi desenvolvida uma espuma dental em que foi incorporado os óleos essenciais. Através do método de liofilização foi desenvolvida uma micropartícula, contendo OELS a partir de um planejamento fatorial, sendo desenvolvido e validado um método de extração em matriz sólida para determinação e quantificação do timol na micropartícula. **Resultados** - O rendimento do OELS e o teor de timol sofrem influência da temperatura máxima e temperatura mínima respectivamente. Quanto à composição química, ocorrem alterações qualitativas e quantitativas no decorrer do ano. Os óleos do estudo apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, sendo determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada um deles, variando de 1,45 – 4,72 mg.mL⁻¹ para OELS, 0,46 – 2,94 mg.mL⁻¹ para OECC e 8,48 – 169,69 mg.mL⁻¹ para OECL. A espuma dental em todas as concentrações testadas apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos do estudo, apresentando maiores halos de inibição frente a *C. albicans* (18,4 – 23,7 mm). No desenvolvimento das micropartículas foi verificado que as condições experimentais que continham hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) apresentaram maior percentual de recuperação de timol. **Conclusão:** A espuma dental desenvolvida apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos do estudo em todas as concentrações e associações testadas. Em conjunto com os testes de citotoxicidade realizados, os resultados nos direcionam para uma formulação promissora para o manejo terapêutico das lesões ulcerativas da mucosa bucal.

Palavras chaves: *Lippia sidoides* Cham.; lesões na cavidade bucal; óleo essencial; espuma dental.

ABSTRACT

Introduction - Ulcerative lesions in the oral cavity cause pain and interfere in the patient's quality of life. **Objective** - To evaluate in vitro the essential oil of *Lippia sidoides* Cham., In the perspective of developing a pharmaceutical form indicated for lesions in the buccal cavity. **Methods** - The essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (OELS) was extracted from the aerial parts of the plant and its oil was characterized by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The major component, thymol, was quantified using a method developed and validated in Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (CG-FID). A seasonal study was carried out to verify thymol content and yield in relation to climatic variables. The antimicrobial activity of OELS, the essential oils associated with *Cymbopogon citratus* and *Citrus limon* and the developed dental foam was verified against the microorganisms *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* through agar diffusion, microdilution and checkerboard assays and cytotoxicity of oils evaluated. A dental foam was developed in which the essential oils were incorporated. Using a freeze-drying method, a microparticle was developed, containing OELS from a factorial design, and a solid matrix extraction method was developed and validated for determination and quantification of thymol in the microparticle. **Results** - The yield of the OELS and the thymol content are influenced by the maximum temperature and minimum temperature, respectively. Regarding chemical composition, qualitative and quantitative changes occur throughout the year. The study oils presented antimicrobial activity against all the microorganisms tested, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for each of them, ranging from 1.45 - 4.72 mg.mL⁻¹ to OELS, 0.46-2 , 94 mg.mL⁻¹ for OECC and 8.48 - 169.69 mg.mL⁻¹ for OECL. The dental foam at all tested concentrations presented antimicrobial activity against the microorganisms of the study, presenting larger halos of inhibition against *C. albicans* (18.4 - 23.7 mm). In the development of the microparticles, it was verified that the experimental conditions containing hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) presented a higher percentage of thymol recovery. **Conclusion** - The developed dental foam presented antimicrobial activity against all the microorganisms of the study in all concentrations and associations tested. In conjunction with the cytotoxicity tests performed, the results point to a promising formulation for the therapeutic management of oral mucosal ulcerative lesions.

Key words: *Lippia sidoides* Cham; lesions in the oral cavity; essential oil; dental foam

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das úlceras.....	35
Figura 2 - Estrutura química do timol e carvacrol.....	53
Figura 3 - Imagem de <i>Lippia sidoides</i> Cham. (Alecrim pimenta).....	56
Figura 4 - Imagem de <i>Lippia sidoides</i> Cham. (Alecrim pimenta). Floração.....	56
Figura 5 – Imagem de <i>Cymbopogon citratus</i> (Capim-limão).....	57
Figura 6 - Estrutura química do citral.....	58
Figura 7- Estrutura química do geranial e neral.	58
Figura 8 - <i>Citrus limon</i> (Limão siciliano).....	60
Figura 9 – Limoeiro.....	60
Figura 10 - Estrutura química do limoneno.....	62
Figura 11 - Roteiro metodológico do estudo.	79
Figura 12 - Cromatograma referente à seletividade do método de quantificação do timol no OELS pelo CG-DIC. (A) Hexano; (B) Solução padrão de timol; (C) Solução padrão de carvacrol; (D) Solução padrão de timol/carvacrol; (E) Solução de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. (OELS).....	87
Figura 13 – (A) Curvas de calibração (C1, C2 e C3) e (B) linearidade média, obtidas para avaliação da linearidade do método para quantificação do timol no OELS, utilizando CG-DIC.	88
Figura 14 - Gráficos das séries: (A) temperatura mínima (°C), (B) temperatura máxima (°C), (C) umidade relativa do ar (%) e (D) insolação (h) de janeiro a dezembro de 2016.....	99
Figura 15 - Séries de rendimento (A) e teor de timol (B) de janeiro a dezembro de 2016, em porcentagem	100
Figura 16 - Gráfico de dispersão entre rendimento (%) e teor de timol (%) de janeiro a dezembro de 2016.	101
Figura 17 - Contribuição parcial da variável temperatura mínima (°C) para o teor médio de timol (%).	102
Figura 18 - Gráfico dos quantis residuais normalizados versus ordem das observações do modelo para o teor de timol (%).	103
Figura 19 - Gráfico dos quantis residuais normalizados do modelo para teor de timol (%). .	103

Figura 20 - Contribuição parcial da variável temperatura máxima (°C) para o percentual de rendimento.....	104
Figura 21. Gráfico dos quantis residuais normalizados versus ordem das observações do modelo para percentual de rendimento.....	105
Figura 22. Gráfico dos quantis residuais normalizados do modelo para percentual de rendimento.....	105
Figura 23 - Cromatograma do OELS (Janeiro/2016) por CG-EM.....	109
Figura 24 - Espectro de RMN 1H (CDCl ₃ , 400 MHz) do OELS e do timol.....	
Figura 25 - Espectro de RMN 13C (CDCl ₃ , 100 MHz) do OELS e do timol.....	117
Figura 26 - Teste da membrana corialantóide do ovo da galinha (HET-CAM).....	125
Figura 27 – Imagens obtidas no teste da membrana corialantóide do ovo da galinha (HET-CAM). (A) OELS 0,25% inicial, (B) OELS 0,25% final, (C) OELS 0,5% inicial, (D) OELS 0,5% final, (E) OECC 0,3% inicial, (F) OECC 0,3% final, (G) OECL 0,2% inicial e (H) OECL 0,2% final.....	134
Figura 28 - Resultado em porcentagem de hemólise dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL).	136
Figura 29 - Percentual de recuperação para os diferentes níveis de água.	155
Figura 30 - Percentual de recuperação para os diferentes tempos de vórtex.....	156
Figura 31 - Percentual de recuperação para os diferentes tempos de centrifuga.....	158
Figura 32 - Fluxograma do método de extração em matriz sólida.	159
Figura 33 - Cromatogramas referentes à seletividade do método de extração em matriz sólida para quantificação do timol. (A) Hexano; (B) Excipientes (placebo); (C) Solução padrão de timol; (D) Excipientes/timol; (E) Excipientes/timol/OELS; (F) Solução de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. (OELS).....	160
Figura 34 - Curvas de calibração (C1, C2 e C3) e (B) linearidade média, obtidas para avaliação da linearidade do método de quantificação do timol a partir do método de extração em matriz sólida, utilizando CG-DIC.....	161
Figura 35 - Sequência de preparação da emulsão.....	176
Figura 36 - Gráfico de superfície para dissolução das amostras obtidas a partir do planejamento fatorial.....	178
Figura 37 - Gráfico de Pareto.	179

Figura 38 - Fotomicrografias de MEV do microparticulado, contendo OELS.	180
Figura 39 - Gráficos de tamanho de partículas (A) e forma (B) do microparticulado, contendo OELS por FlowCam®.	181
Figura 40 - Curvas de DSC do óleo de <i>L. sidoides</i> (OELS), Micropartícula (C1) e os excipientes maltodextrina (MALTO), carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e laurilsulfato de sódio (LSS).	182
Figura 41 - Espectros de FTIR do OELS, microparticulado (MP) e excipientes.....	186

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação do potencial de irritação.....	178
Quadro 2 – Produtos obtidos a partir da incorporação dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) ao líquido espuma.....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos para linearidade do timol.....	88
Tabela 2 - Estimativas, erros padrão e p-valores para os parâmetros do modelo com os dados de linearidade média.....	89
Tabela 3 - Dados dos parâmetros de linearidade para o timol.....	89
Tabela 4 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade.	90
Tabela 5 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária.....	91
Tabela 6 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método.....	92
Tabela 7 - Resultado obtido para robustez com amostras de padrão timol e óleo essencial para variação de temperatura do injetor (250°C e 270°C) e variação da marca de solvente utilizado (hexano).	92
Tabela 8 - Porcentagem de umidade calculada a partir das amostras das partes aéreas de <i>L. sidoides</i> Cham.....	98
Tabela 9 - Medidas descritivas das variáveis climáticas para o período de janeiro a dezembro de 2016.	99
Tabela 10. Resultados do modelo beta semiparamétrico para a variável teor de timol (%). .	102
Tabela 11. Resultados do modelo beta semiparamétrico para a variável percentual de rendimento.	104
Tabela 12 - Composição química do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham.....	108
Tabela 13 - Composição química do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. no período de janeiro a dezembro de 2016.....	110
Tabela 14 – Teor de timol (%) no óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. por CG-DIC.	111
Tabela 15 - Comparação da composição química do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. em dois períodos de análise (2017 e 2018) por CG-EM.	113
Tabela 16 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham. (OELS) pelo método de difusão em ágar.....	128
Tabela 17 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de OELS, OECC e OECL pelo método de difusão em ágar. A clorexidina (CLX) 0,12% usada como controle positivo e o Tween® 80 5% como controle negativo.	128

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) pelo método de microdiluição contra bactérias e fungos apresentadas como concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) em mg.mL ⁻¹	130
Tabela 19 - Resultado da atividade dos óleos essenciais associados pelo método de <i>Checkerboard</i>	131
Tabela 20 - Resultados obtidos no HET-CAM para os óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) e espuma dental. Os efeitos de hemorragia, vasoconstrição e coagulação são apresentados em segundos e correspondem à média dos ovos analisados.....	133
Tabela 21 - Resultado do teste de hemólise dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL)..	136
Tabela 22 - Atividade antimicrobiana das espumas dental (ED) pelo método de difusão em ágar. A clorexidina (CLX) 0,12% usada como controle positivo e o Tween® 80 5% como controle negativo.	143
Tabela 23 - Combinações de parâmetros para avaliação da recuperação.....	153
Tabela 24 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes níveis de água.....	154
Tabela 25 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes tempos de vórtex.	156
Tabela 26 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes tempos de centrífuga.	157
Tabela 27 - Resultados obtidos para linearidade do timol.....	161
Tabela 28 - Estimativas, erros padrão e p-valores para os parâmetros do modelo com os dados de linearidade média.....	162
Tabela 29 - Dados dos parâmetros de linearidade para o timol.....	162
Tabela 30 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade para o método de extração do timol em matriz sólida a partir da solução padrão de timol.	163
Tabela 31 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária para o método de extração do timol em matriz sólida.....	163
Tabela 32 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade para o método de extração do timol a partir da solução contaminada.	164
Tabela 33 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária para o método de extração do timol a partir da solução contaminada.....	164

Tabela 34 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de extração do timol em matriz sólida.....	165
Tabela 35 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de extração do timol em matriz sólida a partir da solução contaminada.....	165
Tabela 36 - Resultado obtido para robustez do método de extração do timol em matriz sólida na solução de timol e na solução contaminada para variação de volume de água usado no processo, tempo de agitação em vórtex e tempo de centrifugação.....	166
Tabela 37 - Fatores e níveis analisados no planejamento fatorial 2^3	170
Tabela 38 - Combinações possíveis do planejamento fatorial 2^3	171
Tabela 39 - Valores obtidos na recuperação do timol a partir do microparticulado, contendo OELS.	177
Tabela 40 – Dados estatísticos (Anova) para o planejamento fatorial 2^3 aplicada à recuperação do timol a partir do microparticulado, contendo OELS.	178
Tabela 41 – Eventos do DSC para o OELS, microparticulado (C1), maltodextrina (MALTO), hidroxipropilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC) e laurilsulfato de sódio (LSS), com o registro da ΔT (T_{onset} - T_{endset} - T_{pico}) em $^{\circ}C$ e ΔH ($J.g^{-1}$).	178
Tabela 42 – Principais bandas de absorção do OELS, micropartículas e excipientes a partir do FTIR.....	178

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

ATR – Acessório de reflectância total atenuada

BHI – Brain Heart Infusion

BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa

C – Carbono

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CFO – Conselho Federal de Odontologia

CG – Cromatografia gasosa

CG – DIC – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

CG - EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLX – Clorexidina

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ – Gás carbônico

CV% - Coeficiente de Variação Percentual

d – Densidade

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

EAR – Estomatite Aftosa Recorrente

ED – Espuma Dental

FTIR - Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FV – Fontes de variação

g – grama

GL – Graus de liberdade

H – Hidrogênio

h – hora

HET – CAM - Hen's Egg Tests on the chorioallantoic membrane

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose.

IC – Inclinação da curva de calibração

ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionada

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPeFarM – Instituto de Pesquisa em fármacos e Medicamentos

KCl – Cloreto de potássio

L – Litro

LABIAL – Laboratório de Biologia Bucal

LCMA – Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LSS – Lauril Sulfato de Sódio

m – Massa

MD – Maltodextrina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MP - Microparticulado

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

OE – Óleo essencial

OECC – Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

OECL – Óleo essencial de *Citrus limon*

OELS – Óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

pf – Ponto de fusão

r – Coeficiente de correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

RMN – Ressonancia Magnética Nuclear

SM – Solução Mãe

SUS – Sistema Único de Saúde

T_{onset} – Temperatura inicial

T_{endset} – Temperatura final

T_{pico} – Temperatura do pico

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

V – Volume

ΔH – Variação de entalpia

ΔT – Variação de temperatura

μL – Microlitro

μg – Micrograma

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. REFERENCIAL TEÓRICO	35
3.1 Lesões ulcerativas da cavidade bucal	35
3.2 Plantas medicinais	45
3.2.1 Sazonalidade.....	47
3.3 Óleos essenciais	50
3.3.1 Considerações sobre <i>Lippia sidoides</i> Cham.	53
3.3.2 Considerações sobre <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	56
3.3.3 Considerações sobre <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. (pro. sp.)	59
3.4 Formas farmacêuticas para cavidade bucal	62
3.5 Microencapsulação	64
3.6 Estudo de caracterização dos óleos essenciais.....	67
3.6.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)	67
3.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	67
3.7 Avaliação de produtos odontológicos e princípios ativos.....	68
3.7.1 Atividade antimicrobiana	68
3.7.2 Citotoxicidade.....	72
3.8 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG- DIC)	73
3.9 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos	74
3.9.1 Seletividade	75
3.9.2 Linearidade	75
3.9.3 Limite de detecção (LD) e limite quantificação (LQ)	76
3.9.4 Exatidão	77
3.9.5 Precisão.....	77
3.9.6 Robustez	77

CAPÍTULO II

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TIMOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA – CG-DIC	81
4.1 Materiais e Métodos	81
4.1.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. (OELS)	81
4.1.2 Caracterização do OELS	82
4.1.3 Materiais	82
4.1.4 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	82
4.1.5 Preparação das soluções padrão de timol, carvacrol e óleo essencial	82
4.1.6 Validação de metodologia analítica por CG-DIC.....	83
4.1.6.1 Seletividade.....	83
4.1.6.2 Linearidade.....	84
4.1.6.3 Limite de quantificação e limite de detecção	84
4.1.6.4 Precisão.....	84
4.1.6.5 Exatidão.....	85
4.1.6.6 Robustez.....	85
4.2 Resultados e Discussão	86
4.2.1 Caracterização do OELS	86
4.2.2 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	86
4.2.3 Seletividade	87
4.2.4 Linearidade	88
4.2.5 Limite de Quantificação e Limite de Detecção	89
4.2.6 Precisão.....	90
4.2.7 Exatidão	91
4.2.8 Robustez	92
4.3 Conclusão	93
CAPÍTULO III	
5. SAZONALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LIPPIA SIDOIDES</i> CHAM. (OELS).....	95
5.1 Materiais e Métodos	95
5.1.1 Determinação da umidade	95

5.1.2 Variáveis climáticas.....	95
5.1.3 Rendimento do óleo essencial	95
5.1.4 Avaliação da composição química do OELS	96
5.1.4.1 Materiais.....	96
5.1.4.2 Preparação das soluções padrão de timol e óleo essencial.....	96
5.1.4.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)	97
5.2 Resultados e Discussão	97
5.2.1 Determinação da umidade	97
5.2.2 Variáveis climáticas.....	98
5.2.3 Rendimento e teor de timol	100
5.2.4 Avaliação da composição química	107
5.2.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)	107
5.2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	115
5.3 Conclusão	117

CAPÍTULO IV

6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>LIPPIA SIDOIDES</i> CHAM., <i>CYMBOPOGON CITRATUS</i> E <i>CITRUS LIMON</i>.	120
6.1 Materiais e Métodos	120
6.1.1 Materiais.....	120
6.1.1.1 Microrganismos do estudo	120
6.1.2 Cultivo e preparação do inóculo para os testes microbiológicos.....	120
6.1.3 Atividade antimicrobiana	121
6.1.3.1 Ensaio de difusão em ágar	121
6.1.3.2 Ensaio de microdiluição.....	121
6.1.3.3 Método de Checkerboard	123
6.1.4 Citotoxicidade.....	124
6.1.4.1 Teste da membrana corioalantóide do ovo da galinha (HET-CAM).....	124
6.1.4.2 Teste de hemólise.....	126
6.1.4.3 Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	127
6.2 Resultados e Discussão	127

6.2.1 Atividade antimicrobiana	127
6.2.1.1 Ensaio de difusão em ágar	127
6.2.1.2 Ensaio de microdiluição.....	129
6.2.1.3 Método de Checkerboard	131
6.2.2 Citotoxicidade.....	133
6.2.2.1 Teste da membrana corioalantóide do ovo da galinha (HET-CAM).....	133
6.2.2.2 Teste de hemólise.....	135
6.2.2.3 Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	137
6.3 Conclusão	138

CAPÍTULO V

7. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESPUMA DENTAL (ED) CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS.....	140
7.1 Materiais e Métodos	140
7.1.1 Materiais	140
7.1.2 Preparação da espuma e incorporação dos óleos essenciais.....	140
7.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana da espuma dental.....	142
7.1.3.1 Ensaio de difusão em ágar	142
7.2 Resultados e Discussão	143
7.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da espuma dental.....	143
7.2.1.1 Ensaio de difusão em ágar	143
7.3 Conclusão	147

CAPÍTULO VI

8. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM MATRIZ SÓLIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DO TIMOL.....	149
8.1 Materiais e Métodos	149
8.1.1 Materiais	149
8.1.2 Desenvolvimento do método de extração em matriz sólida	149
8.1.3 Validação de metodologia analítica.....	149
8.1.3.1 Seletividade.....	150
8.1.3.2 Linearidade.....	150
8.1.3.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção	150

8.1.3.4 Precisão.....	151
8.1.3.5 Exatidão.....	151
8.1.3.6 Robustez.....	152
8.2.1 Desenvolvimento do método de extração em matriz sólida.....	152
8.2.2 Validação da metodologia analítica.....	159
8.2.2.1 Seletividade.....	159
8.2.2.2 Linearidade.....	160
8.2.2.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção	162
8.2.2.4 Precisão.....	162
8.2.2.5 Exatidão.....	165
8.2.2.6 Robustez.....	165
8.3 Conclusão	167

CAPÍTULO VII

9. DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO OELS ATRAVÉS DO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO	169
9.1 Materiais e Métodos	169
9.1.1 Materiais	169
9.1.2 Desenvolvimento da preparação das micropartículas	169
9.1.3 Congelamento e liofilização	169
9.1.4 Delineamento experimental.....	170
9.1.5 Caracterização da micropartícula	171
9.1.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	171
9.1.5.2 Tamanho de partícula - FlowCam®.....	172
9.1.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	172
9.1.5.4 Infravermelho (FTIR).....	172
9.1.6 Atividade antimicrobiana da micropartícula	173
9.1.6.1 Ensaio de difusão em ágar	173
9.2 Resultados e Discussão	173
9.2.1 Desenvolvimento da preparação da micropartícula.....	173
9.2.2 Planejamento Fatorial	176
9.2.3 Caracterização da micropartícula	179

9.2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	179
9.2.3.2 Análise do Tamanho de partícula.....	181
9.2.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	182
9.2.3.4 Infravermelho (FTIR).....	185
9.2.4 Atividade antimicrobiana da micropartícula	188
9.2.4.1 Ensaio de difusão em ágar	188
9.3 Conclusão	189
REFERÊNCIAS	190
ANEXOS	217

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas condições patológicas que podem se apresentar na cavidade bucal, interferindo no bem-estar do paciente e sobre a sua qualidade de vida (BASCONES-MARTINEZ et al., 2005). As lesões ulcerativas presentes comumente na cavidade bucal são caracterizadas pela descontinuidade do tecido cutâneo-mucoso, o que gera alterações na estrutura anatômica ou função fisiológica dos tecidos afetados, gerando exposição de terminações nervosas, resultando, na maioria das vezes, em sintomatologia dolorosa (SCULLY e FELIX, 2005).

Dentre as lesões ulcerativas da cavidade oral, destacam-se a estomatite aftosa recorrente (EAR) e a mucosite oral. A EAR é a lesão mais comum da mucosa oral na população geral. É uma doença multifatorial que afeta cerca de 15 a 25% da população mundial apresentando diversos fatores envolvidos em sua patogênese e pode aparecer secundário a vários processos de doença bem definidos ou em pacientes saudáveis (EDGAR et al., 2017; NASRY et al., 2016). Já a mucosite oral consiste numa inflamação da superfície da mucosa que surge como a complicação mais significativa em oncologia (LAILA, 2006). Estima-se que cerca de 40% dos doentes que realizam ciclos de quimioterapia convencional desenvolvam mucosite oral e nos pacientes com neoplasia da cabeça e pescoço que utilizem terapêutica concomitante de radioterapia e quimioterapia, a sua incidência é de cerca de 100% (L PARKHILL, 2013; BENSINGER et al., 2008).

As formas farmacêuticas mais utilizadas para preparação de produtos odontológicos são: líquidos (enxaguatórios, xaropes e suspensões), semi-sólidos (géis, espuma ou mousse, pastas) e sólidos (APPEL; RÉUS, 2005), devendo a forma farmacêutica favorecer a administração do medicamento, permitindo seu melhor aproveitamento e aceitação. A espuma dental apresenta-se como uma alternativa nos casos de lesões bucais, pois a textura aerada e a leveza da formulação favorecem a aplicação na cavidade oral sobre as lesões.

Para o desenvolvimento de uma formulação, estudos devem ser feitos para se obter informações básicas sobre as características físicas e químicas do fármaco a ser utilizado em uma forma farmacêutica (ALLEN JR. et al., 2007). Na caracterização de produtos vegetais encontram-se dificuldades inerentes à sua própria origem, devido principalmente, a

complexidade de sua composição e a variabilidade na qualidade das drogas obtidas a partir de uma mesma espécie vegetal. Para realizar o controle de qualidade do processo de desenvolvimento de um novo medicamento faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis, principalmente, quando métodos oficiais inexistem, estabelecendo protocolos analíticos desde o preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse (RAO; NAGARUJU, 2003).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo importante papel na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Esses metabólitos têm sido amplamente empregados por suas propriedades observadas na natureza como agente antibacteriano, antifúngico e inseticida (BAKKALI et al., 2008). Segundo Daferera et al. (2003), os óleos essenciais, apresentam baixo risco para o desenvolvimento de resistência microbiana, possivelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, evitando a adaptação dos microrganismos.

Combinações entre óleos essenciais de plantas diferentes podem alcançar o mesmo potencial descrito para óleos isolados, porém em menores concentrações, favorecendo o emprego como antimicrobianos de uso clínico, sendo uma alternativa para o controle de bactérias multirresistentes (GUTIERREZ et al. 2008).

As plantas medicinais podem representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a esses compostos, devido à variedade de mecanismos de atuação dos metabólitos, além de apresentarem uma menor incidência de efeitos colaterais, toxicidade relativa diminuída e baixo custo (SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2006).

Considerando a prevalência de lesões ulcerativas na cavidade oral e do desconforto que provocam aos pacientes, prejudicando a mastigação, deglutição e a fonação, faz-se necessário estudos de novas alternativas para prevenção e tratamento dessas lesões. Em vista da necessidade de novas formulações e de opções naturais para o tratamento de lesões ulceradas em cavidade bucal, foi desenvolvida uma espuma dental, contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e os óleos de *Cymbopogon citratus* e *Citrus limon* em associação. Sendo assim, a proposta desse trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana da espuma dental contendo óleos

essenciais para prevenção e tratamento das lesões bucais. A espécie *L. sidoides* Cham. está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., para desenvolver uma forma farmacêutica indicada para lesões na cavidade bucal.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar as partes aéreas da *L. sidoides* Cham., extrair e caracterizar seu óleo essencial;
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de timol no óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (OELS) por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC);
- Avaliar a concentração de timol e o rendimento do OELS em relação ao período de coleta e as variáveis climáticas através de um estudo de sazonalidade;
- Verificar atividade antifúngica e antibacteriana do OELS, OECC, OECL e do produto desenvolvido;
- Determinar a CIM, CBM/CFM dos óleos essenciais de *L. sidoides* Cham. *Cymbopogon citratus* (OECC) e *Citrus limon* (OECL) frente aos microrganismos do estudo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*);
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL);
- Verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) quando em associação;
- Incorporar os óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) em uma forma farmacêutica para prevenção e tratamento de lesões bucais;
- Desenvolver e validar o método de extração em matriz sólida para quantificação do timol nas micropartículas contendo OELS;

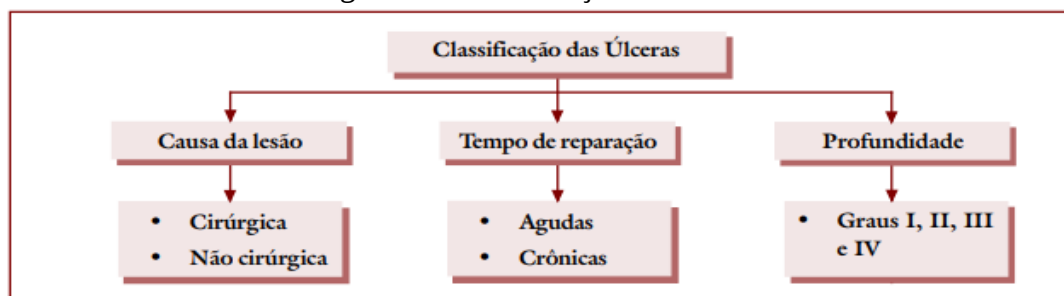
- Desenvolver micropartículas, contendo OELS através do método de liofilização;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da micropartícula contendo OELS.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lesões ulcerativas da cavidade bucal

As lesões ulcerativas presentes comumente na cavidade bucal são caracterizadas pela descontinuidade do tecido cutâneo-mucoso, o que gera alterações na estrutura anatômica ou função fisiológica dos tecidos afetados. As úlceras podem ser classificadas quanto à causa, em: cirúrgicas, não cirúrgicas; segundo o tempo de reparação, em agudas e crônicas, e, de acordo com a profundidade, em relação à extensão da parede tissular envolvida (epiderme, derme, subcutâneo e tecidos mais profundos, como músculos, tendões, ossos e outros), em graus, I, II, III e IV como demonstrado na Figura 1 (BRASIL, 2002).

Figura 1 – Classificação das úlceras.



Fonte: Brasil (2002)

Segundo Brasil (2002) no que diz respeito a classificação quanto a profundidade da lesão, as de grau I apresentam um comprometimento da epiderme onde a pele se encontra íntegra mas apresenta sinais de hiperemia, descoloração ou endurecimento; já as de grau II ocorrem a perda parcial de tecido envolvendo a epiderme ou a derme e a ulceração é superficial em forma de escoriação ou bolha; as lesões de grau III exibem um comprometimento da epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo) e as lesões de grau IV um comprometimento da epiderme, derme, hipoderme e tecidos mais profundos.

As lesões ulcerativas da cavidade bucal, na maioria dos casos, apresentam aparência clínica similar, apesar da variável etiologia, podendo ser uma manifestação de diversas doenças sistêmicas, incluindo doenças infecciosas, imunológicas e neoplásicas. Assim, é importante um

diagnóstico diferencial que considere os fatores predisponentes e a história clínica (REGEZI et al., 2008).

Dentre as lesões ulcerativas mais comumente encontradas na cavidade oral podemos citar a estomatite aftosa recorrente (EAR) e a mucosite oral radioinduzida.

A estomatite aftosa é um processo inflamatório doloroso e frequentemente recorrente da mucosa oral que pode aparecer secundário a vários processos de doença bem definidos (EDGAR et al., 2017)

As úlceras orais comumente referidas como aftas, são a lesão mais comum da mucosa oral na população geral. É uma doença multifatorial que afeta cerca de 15 a 25% da população mundial apresentando diversos fatores envolvidos em sua patogênese (EDGAR et al., 2017; NASRY et al., 2016), sendo presenciada rotineiramente por médicos e odontólogos em pacientes saudáveis.

O termo afta é derivado da palavra grega *aphthi*, que significa “incendiar” ou “inflamar”, e acredita-se que tenha sido usado pela primeira vez pelo filósofo Hipócrates para descrever a dor associada a um distúrbio comum da boca durante um período de tempo (EDGAR et al., 2017).

Vários fatores etiológicos são descritos: trauma local, fatores genéticos, deficiências nutricionais, infecções virais e bacterianas e distúrbios imunológicos ou endócrinos, que podem estar relacionados ao surgimento das lesões orais frequentes. Em alguns pacientes, nenhuma etiologia pode ser identificada e um diagnóstico de exclusão deve ser feito, sendo esses casos referidos como estomatite aftosa recorrente (EAR).

No aspecto clínico, as lesões ulcerativas se apresentam de três formas, normalmente sintomáticas: minor (> 70% dos casos), major (10%) e herpetiforme (10%), sendo os subtipos diferentes em relação à morfologia, distribuição, gravidade e prognóstico. Embora apresentem características distintas, todas as formas de EAR têm um impacto significativo na qualidade de vida e interferem nas atividades da vida diária (EDGAR et al., 2017). A do tipo minor é a mais frequente e é caracterizada por lesões pequenas, únicas ou múltiplas, ovoides ou arredondadas com base crateriforme, apresentando contorno bem definido e halo eritematoso com material amarelado purulento. A major, conhecida como afta de “Sutton”, possui diâmetro maior ou

igual a 10 mm que deixam cicatrizes após a fase de reparação, podendo durar até 42 dias, estando localizada, prevalentemente, no palato mole e na mucosa labial, sendo considerada o tipo mais grave. A menos comum é a do tipo herpetiforme, apresentando-se como lesões pequenas e numerosas (chegando a 100 lesões ao mesmo tempo), variando entre 1 a 3 mm podendo ulcerar e persistir por cerca de 10 dias (KINGEL et al., 2007; SCULLY et al., 2002; ZUNT, 2003).

Normalmente, 24 a 48 horas antes do aparecimento de uma úlcera, a maioria dos pacientes sentem uma picada ou sensação de queimação na área afetada. A úlcera geralmente ocorre na mucosa oral não queratinizada, incluindo os lábios, a mucosa bucal, o assoalho da cavidade bucal, o palato mole, e a superfície ventral da língua. Já as regiões de mucosa oral queratinizada, como o palato duro, as gengivas e a superfície dorsal da língua, são locais incomuns (BARRONS, 2001).

Devido à incerteza de sua etiologia e ao curso imprevisível da doença, não há tratamento definitivo para a EAR. Em formas graves de EAR, agentes sistêmicos como colchicina, dapsona e corticosteróides podem ser administrados para controlar os sintomas. Entretanto, a maioria dessas terapias está associada a efeitos colaterais ou reações indesejadas. Diversos agentes tópicos estão disponíveis para o alívio dos sintomas em formas menos graves de EAR. Estes incluem agentes antibacterianos, anti-inflamatórios, anti-histamínicos, além de analgésicos, anestésicos locais e glicocorticóides (GHALAYANI et al., 2013; SCULLY et al., 2002; EDGAR et al., 2017).

De acordo com Barrons (2001), as úlceras, que geralmente ocorrem em mucosa oral não queratinizada, pode causar dor considerável, podendo interferir na alimentação, na fala e na deglutição. Os fatores precipitantes mais prováveis são trauma e estresse e podem estar associados fatores que incluem doenças sistêmicas, alergias alimentares, predisposição genética, distúrbios imunológicos, uso de certos medicamentos e infecção pelo HIV. Os principais objetivos da terapia para EAR incluem o alívio da dor, redução da duração da úlcera e restauração da função oral normal. Além disso, objetivos secundários incluem diminuição da frequência e gravidade das recorrências e manutenção da remissão. Medicamentos tópicos, tais como enxaguatórios bucais antimicrobianos e corticosteroides tópicos podem alcançar os objetivos principais, mas não está evidente que altere a recorrência ou as taxas de remissão.

Medicamentos sistêmicos podem ser necessários quando a terapia tópica é ineficaz. Corticosteróides orais devem ser reservados para casos graves de EAR que não respondem a medicamentos tópicos.

O manejo do EAR pode ser muito desafiador, especialmente em pacientes com doença grave. Quando a lesão oral é secundária a uma doença subjacente, é aconselhável tratar a doença primária para melhorar as aftas orais (EDGAR et al., 2017).

O tempo necessário para a cura de úlceras aftosas tem sido correlacionado com a capacidade antimicrobiana de enxaguatórios bucais para reduzir a população da flora da mucosa oral (MEILLER et al., 1991). Já os corticosteroides de uso tópico, em pacientes com EAR destina-se a limitar o processo inflamatório associado com a formação de aftas, atuando diretamente nos linfócitos T ou alterando a resposta das células efetoras que precipitam a imunopatogênese, como por exemplo, as alergias alimentares, trauma e microorganismos (VICENT et al., 1992)

A terapia com laser de baixa intensidade em um comprimento de onda de 658nm também pode ser benéfica como adjuvante em pacientes com EAR. A utilização de laser mostrou-se igual ou até superior ao tratamento farmacológico no manejo da dor e inflamação, aumentando a reepitelização das úlceras aftosas (LALABOVNA et al., 2014). A terapia a laser proporciona melhores respostas antiinflamatórias com redução do edema, redução da dor e bioestimulação celular (AGGARWAL et al., 2014)

Amanlou et al. (2007) avaliaram em seu estudo a eficácia do extrato de *Satureja khuzistanica* Jamzad e suas preparações com óleo essencial no tratamento da estomatite aftosa recorrente (EAR) para confirmar seu uso cultural como analgésico e cicatrizante. Neste estudo 60 pacientes com aftas menores foram selecionados e divididos aleatoriamente em três grupos onde os grupos A e B receberam preparações tópicas do extrato de *S. khuzistanica* e óleo essencial de *S. khuzistanica*, respectivamente. O grupo C (grupo controle) recebeu solução hidroalcoólica como placebo. O tempo de eliminação da dor e o tempo da cura completa foram registrados. Como resultados foi verificado que o tempo médio de eliminação da dor mostrou diferenças significativas ($p = 0,0001$) entre os grupos A ($3,40 \pm 0,50$ dias) e o grupo B ($3,20 \pm 0,41$ dias) em relação ao grupo C ($5,70 \pm 1,12$ dias). A duração média da cicatrização completa também mostrou diferenças significativas ($p = 0,0001$) entre o grupo A ($5,90 \pm 1,24$ dias) e o

grupo B ($6,85 \pm 1,30$ dias) em comparação ao grupo C ($10,40 \pm 1,66$ dias). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos A e B em relação à média da duração da cicatrização completa das lesões e ao tempo médio de eliminação da dor ($p = 0,10$ e $0,085$, respectivamente), demonstrando que os resultados obtidos para o extrato de *S. khuzistanica* (grupo A) foram semelhantes aos do grupo B (óleo essencial de *S. khuzistanica*), porém os achados deste estudo revelaram que os extratos de *S. khuzistanica* e óleo essencial de *S. khuzistanica* apresentaram melhores efeitos no tratamento do EAR do que o placebo. Assim, o estudo concluiu que o *S. khuzistanica* é um fitoterápico eficaz para o manejo de aftas menores, confirmando o uso cultural da planta.

No estudo de Ghalayani et al. (2013), foi avaliado a eficácia do extrato de *Punica granatum* (PG) no manejo clínico do EAR. 40 pacientes com EAR participaram deste estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. Neste estudo a eficácia do gel tópico de PG (10%) durante três episódios de EAR, foi avaliada. Os pacientes foram aleatoriamente designados para usar gel placebo ou gel PG diariamente. O tempo de eliminação da dor e o tempo de cicatrização completa foram registrados e o grau de dor foi verificado e registrado por cada paciente em diferentes intervalos de tempo: no dia 0 e nos dias 1, 3, 5 e 7 depois da utilização do produto. Os dados foram analisados estatisticamente, usando ANOVA, teste t pareado e independente. O estudo concluiu que o tempo médio de eliminação da dor mostrou uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre o grupo PG ($3,4 \pm 1,09$) e grupo placebo ($5,9 \pm 0,6$) e a duração média da cura completa também mostrou diferença significativa ($P < 0,001$) entre o grupo PG ($5,3 \pm 0,81$) e o grupo placebo ($8,6 \pm 0,99$). A escala analógica visual usada para medir a dor, no grupo PG foi significativamente menor do que grupo placebo em todos os intervalos de tempo (dia 1 a dia 7) ($P < 0,001$), revelando que o extrato de PG na forma de gel oral (10%) pode ser benéfico na redução da dor do EAR e tem um efeito positivo na redução do tempo de cura completa.

O uso de produtos naturais, incluindo preparações de plantas medicinais para redução da dor e encurtamento do tempo de cicatrização das úlceras aftosas orais, vem ganhando mais atenção devido à diminuição dos efeitos colaterais e à resistência aos medicamentos (GHALAYANI et al., 2013).

Heydarpour et al. (2018) publicaram um estudo que teve como objetivo revisar os ensaios clínicos sobre a eficácia de plantas medicinais e seus fitoquímicos ativos no tratamento da EAR. Foram pesquisadas cinco bases de dados, incluindo PubMed, Science Direct, Web of Science, Scopus e Cochrane Library para recuperar todos os ensaios clínicos relevantes, mostrando resultados que indicam que uma ampla gama de evidências científicas aprovou os benefícios terapêuticos dos medicamentos naturais no manejo da EAR, incluindo *Satureja khuzistanica*, *Aloe vera*, Mirra, *Glycyrrhiza glabra*, *Alquimil vulgaris*, *Myrtus communis*, *Melissa officinalis*, *Rhizophora mangle*, camomila, *Rosa damascena*, *Nicotiana tabacum*, *Punica granatum*, *Ageratina pichinchensis*, noruega Longo Vital, óleo de lavanda e óleo de Perilla que são conhecidas plantas medicinais anti-aftosas. Berberina e acemanano são substâncias bioativas com diversos benefícios farmacológicos e terapêuticos em pacientes com afta, o que os torna alternativas promissoras para novos fármacos farmacológicos. Este estudo de revisão fornece evidências de que as plantas medicinais podem ser consideradas futuras drogas farmacêuticas ou podem ser usadas como tratamento adjuvante em abordagens terapêuticas convencionais para melhorar sua eficácia e aliviar os efeitos colaterais no manejo da EAR. Estudos clínicos adicionais também são necessários para confirmar a eficácia e segurança de produtos naturais derivados de plantas com efeitos potenciais no tratamento da EAR.

A mucosite oral consiste em uma inflamação da superfície da mucosa da cavidade bucal, sendo a complicação mais significativa em tratamentos oncológicos. (AL-DASOOQI et al., 2013; BENSINGER et al., 2008). É caracterizada por eritema, edema, atrofia, inflamação e ulceração bilaterais da mucosa oral, estando associada a xerostomia, alterações do paladar e aumento do risco de incidência de infecções orais (LALLA et al., 2014), sendo a dor um dos principais sintomas associados. A mucosite oral é o efeito colateral agudo mais importante e mais estudado decorrente da radioterapia em cavidade bucal (AL-DASOOQI et al., 2013; DÖRR et al., 2001; KÖSTLER et al., 2001; PLEVOVÁ, 1999), gerando dor significativa que afeta a capacidade dos pacientes de se alimentar, dificultando a deglutição de alimentos sólidos e às vezes líquidos, o que pode limitar a fala e o processo de mastigação, além de favorecer a exposição do paciente a infecções por microrganismos oportunistas, gerando uma diminuição da qualidade de vida do paciente irradiado (AL-DASOOQI et al., 2013; KÖSTLER et al., 2001; SCULLY E PORTER, 2001). Há a necessidade de uso de analgésicos rotineiramente, afetando

a rotina de vida e aumentando o custo, reduzindo a tolerabilidade ao tratamento do câncer (AL-DASOOQI et al., 2013). Além disso, em quadros de maior gravidade de mucosite oral, pode ocorrer a interrupção parcial ou completa da radioterapia antes do regime planejado ser completado, aumentando o risco de proliferação das células tumorais e dificultando o controle do câncer (BENSINGER et al., 2008; BONAN et al., 2005; DÖRR et al., 2001). Nos casos mais graves pode estar associada a febre, podendo ser necessário o uso de analgésicos por via endovenosa e também nutrição parenteral total (CAWLEY e BENSON, 2005). Outros fatores podem interferir no aumento da incidência ou agravamento da mucosite, como o uso do álcool e tabaco, a necessidade de associação da quimioterapia, o hiperfracionamento das doses, infecções fúngicas e uma inadequada higienização bucal (BONAN et al., 2005; TROTTI et al., 2003; KÖSTLER et al., 2001).

A incidência e o grau de agressão à mucosa está diretamente relacionado ao tipo de radiação ionizante empregada, taxa de distribuição, dose total empregada, associação com agentes quimioterápicos, resposta individual a terapia, fatores como o uso do tabaco e do álcool e níveis de EGF (fator de crescimento epitelial) e PAF (fator de ativação plaquetária) presentes na saliva (BONAN et al., 2005; TROTTI et al., 2003; KÖSTLER et al., 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em termos de incidência, a mucosite oral pode surgir em praticamente todos os doentes (cerca de 97%) que estejam em tratamento com radioterapia na área da cabeça ou pescoço, mais de 75% dos doentes que fazem regimes de condicionamento para preparação para o transplante da medula óssea, e em aproximadamente 40 % dos doentes submetidos a quimioterapia (PETERSON et al., 2011; FADDA et al., 2006).

A mucosite em pacientes submetidos a quimioterapia administrada por via endovenosa, apresenta-se preferencialmente de forma aguda, surgindo frequentemente 4 a 7 dias após o início da terapêutica e tem o seu pico por volta de duas semanas depois. A remissão surge cerca de 21 dias após o tratamento. Já no caso da mucosite induzida por radioterapia, o início ocorre de forma mais gradual, devido o fracionamento das doses durante várias semanas. No entanto, a intensidade e incidência dependem do tipo de câncer, do tipo de tratamento necessário e o objetivo pretendido (LALLA et al., 2009; RUBENSTEIN et al., 2004).

Além da mucosite oral, os principais efeitos colaterais apresentados na cavidade bucal em decorrência da radioterapia incluem xerostomia, trismo, cárie por radiação, candidose,

osteorradionecrose e a hiperpigmentações em mucosa (BONAN et al., 2003; SCULLY E PORTER, 2001; SCULLY E PORTER, 2000).

Em um estudo metanalítico, Trotti et al. (2003), relataram após análise de diversos estudos sobre mucosite oral, que 97% de 2875 pacientes desenvolveram mucosite devido à radioterapia convencional. Quando houve a necessidade de associar a radioterapia à quimioterapia, observou-se mucosite oral em 89% de 1505 pacientes irradiados, comparados apenas a 22% de 318 pacientes que desenvolveram mucosite oral pela realização de quimioterapia isoladamente. A insuficiência de dados e sua heterogenicidade impediram a análise da severidade da mucosite e a maior incidência desse efeito colateral esteve diretamente associada com o uso de doses hiperfracionadas.

Um outro fator que pode agravar a mucosite oral é a susceptibilidade à infecção por microorganismos que normalmente estão presentes na cavidade bucal que são oportunistas e invadem os tecidos lesados. Leveduras do gênero *Candida* aumentam a colonização durante a radioterapia (BONAN et al., 2005; SCULLY e EPSTEIN, 1996). Apesar de ter se levantado a hipótese de que bactérias Gram negativas tenham um papel de grande importância no desenvolvimento da mucosite oral, dois estudos que procuraram erradicar seletivamente essas bactérias e *Candida* não conseguiram diminuir a mucosite induzida por radioterapia (BONAN et al., 2005; STOCKMAN et al., 2003; WIJERS et al., 2001).

A intensidade da mucosite oral pode ser mensurada através de índices definidos e descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (HANDSCHEL et al., 2001). Os estudos mais recentes sobre mucosite oral utilizaram-se principalmente da classificação proposta pela OMS, que estabeleceu a graduação da mucosite em 4 níveis (I - ardência, eritema; II -eritema, úlceras, dieta sólida; III -confluência de úlceras, dieta líquida; IV -alimentação via oral não é possível, dieta líquida). Mucosite em graus III e IV (OMS) após a metade do tratamento radioterápico em doses tumoricida são freqüentes (HANDSCHEL et al., 2001). Aproximadamente metade dos pacientes que recebem radioterapia fracionada (56%) desenvolvem mucosite graus III e IV em comparação com 34% dos pacientes que recebem tratamento radioterápico convencional e associação com agentes quimioterápicos, tabagismo e fumo são fatores predisponentes (TROTTI et al., 2003; KÖSTLER et al., 2001).

Em relação à patogênese da mucosite, percebe-se que é muito mais complexa do que simplesmente resultado dos efeitos diretos inespecíficos da radiação ou quimioterapia nas células basais da mucosa de divisão rápida, como acreditava-se. Para descrever a sua fisiopatologia um modelo dividido em cinco fases distintas parece ser, na generalidade, o mais aceito (SONIS, 2004; KÖSTLER et al., 2001; GEORGIOU et al., 2012). Na primeira fase, a de iniciação, a radiação ou quimioterapia ocorrem diretamente alterações do ácido desoxirribonucleico (DNA) das células epiteliais com formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (LIONEL et al., 2011; GEORGIOU et al., 2012) que parecem ser responsáveis pelas agressões às células epiteliais, tecidos adjacentes e vasos sanguíneos (LIONEL et al., 2011). A segunda fase, de sinalização ou geração de mensagens, é caracterizada pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina 1 β , IL-2 e IL-6, prostaglandinas, fator de necrose tumoral α (TNF α), moléculas de adesão e ativação de enzimas como a esfingomielinase ácida e neutra e a ceramida sintetase. A partir desta ativação, ocorre a indução das células endoteliais da submucosa e dos fibroblastos a iniciar a cascata de apoptose, promovendo a destruição dos fibroblastos e gerando fibronectina que destrói o tecido conjuntivo (LIONEL et al., 2011). Esta fase, também denominada inflamatória, é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e consequente acumulação local de fármacos citotóxicos, agravando ainda mais o processo. Na amplificação, 3ª fase, as citocinas ativam cascatas pró-inflamatórias e levam à lesão de estruturas subjacentes. Nesta fase, a mucosa ainda apresenta um aspecto relativamente saudável, exibindo apenas pequenos eritemas. Na 4ª fase, a de ulceração, existe perda da integridade da mucosa, surgindo lesões dolorosas que poderão favorecer a entrada de bactérias, vírus e fungos. Esta reação é mais evidente em doentes neutropênicos. Além disso, a colonização de microrganismos leva ao acúmulo de endotoxinas que aceleram a liberação local de fatores de inflamação e agravam a resposta inflamatória (KÖSTLER et al., 2001). É por este motivo que a utilização de agentes antimicrobianos locais poderá ter a sua utilidade. Esta fase é coincidente com a diminuição do número de neutrófilos (LIONEL et al., 2011). Na 5ª fase, a fase de cura, ocorre proliferação, diferenciação e migração de células epiteliais com o intuito de restaurar a integridade da mucosa (PETERSON et al., 2011).

Os tratamentos empregados para a mucosite oral induzida por radioterapia são paliativos e diversificados e envolvem terapêuticas profiláticas e tentativas de atenuar a sintomatologia dolorosa (BONAN et al., 2005; KÖSTLER et al., 2001; SCULLY E PORTER, 2001). As

terapias incluem abordagens profiláticas como conscientização para a melhoria na higiene oral, evitar a utilização de alimentos picantes e tabaco, uso de fatores de crescimento (EGF (fator de crescimento epidérmico), GM-CSF (fator estimulante de colônia granulocítico macrofágico, KGF (fator de crescimento para ceratinócitos), sais de alumínio (sucralfato), citocinas (interleucina-11), glutamina, citoprotetores e antioxidantes, e sintomáticas como o uso da camomila, betametasona, benzidamida, ácido acetilsalicílico, lidocaína, polimixina E, lozenges, tobramicina, lasers de baixa energia e crioterapia, entre outros (DENHAM e HAUER-JENSEN, 2002; SCULLY E PORTER, 2001; PLEVOVÁ, 1999). Dentre as terapias mais estudadas e empregadas cita-se o sucralfato, clorexidina, descontaminação seletiva, crioterapia, drogas imunomoduladoras e fatores de crescimento de custos variados (KÖSTLER et al., 2001; PLEVOVÁ, 1999).

Uma alternativa para o tratamento da mucosite é a laserterapia. O laser é uma forma de radiação não-ionizante, concentrada, que em contato com os tecidos resulta em efeitos fotoquímicos, fotofísico, fotobiológico e térmico e não-linear. Além de ser uma radiação não invasiva e bem tolerada pelos tecidos, não possui efeitos mutagênicos e pode ser usada, sem riscos, repetidamente (KELNER e LISBOA DE CASTRO, 2007)

A luz laser interage com as células e tecidos e certas funções celulares poderão ser estimuladas tais como: a estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, aumento da produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos de células (KELNER e LISBOA DE CASTRO, 2007).

O uso de laser de baixa intensidade pode ser usado no alívio da dor devido o aumento da concentração de beta endorfina no liquor cefalorraquidiano, na reparação tecidual, pois ativa o estímulo da produção de fibroblastos, com produção de fibras elásticas e colágenas, acelera a mitose nos tecidos irradiados, e no controle da inflamação, por acelerar a microcirculação, originando as alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários (KELNER e LISBOA DE CASTRO, 2007).

Em um estudo randomizado, duplo-cego e com grupo controle, utilizando pacientes submetidos à quimio/radioterapia por câncer de cabeça e pescoço, fez-se a utilização da laserterapia de baixa potência e verificou-se que a incidência de mucosite oral, na sétima sessão de radioterapia, era 3 vezes maior (em porcentagem) no grupo placebo em comparação ao grupo

submetido ao tratamento com laser. Na vigésima primeira e na trigésima quinta, essa proporção caiu para apenas duas vezes, embora ainda indique uma alta influência da laserterapia na recuperação dos pacientes (OTON-LEITE et al., 2015). Em outro estudo randomizado, duplo-cego e com grupo controle placebo, envolvendo pacientes idosos com câncer de cabeça e/ou pescoço em terapia antineoplásica, verificou-se que a laserterapia de baixa potência foi eficaz em diminuir a progressão e a duração da mucosite em si e da dor severa, bem como duração da utilização da alimentação parenteral. Todos os critérios foram comparados entre o grupo controle e o grupo placebo (GAUTAM et al., 2015).

Alternativas para prevenção e tratamento da mucosite radioinduzida, utilizando óleos essenciais de plantas medicinais, estão sendo estudadas. Maddocks-Jennings et al. (2009) realizou um estudo que avaliou os efeitos de um enxaguatório bucal aquoso, contendo óleos essenciais de manuka (*Leptospermum scoparium*) e Kanuka (*Kunzea ericoides*) em pacientes com mucosite radioinduzida na área da orofaringe durante o tratamento para câncer de cabeça e pescoço. Foi observado que a utilização da preparação contendo óleos essenciais, promoveu um atraso no início da mucosite e redução da dor e dos sintomas, em relação aos grupos placebo (gargarejo com água) e de controle (cuidado “usual”). (MADDOCKS-JENNINGS et al., 2009).

3.2 Plantas medicinais

Desde a antiguidade, o homem utiliza as plantas com fins medicinais para o tratamento de doenças, sendo este conhecimento acumulado e transmitido de geração para geração (ARGENTA et al., 2011), atuando como ferramenta para a ciência, na busca por substâncias que possam se tornar ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (MACIEL et al., 2002).

Utilizados na forma bruta ou de extrato vegetal, os remédios derivados de plantas medicinais passaram a despertar o interesse de estudos científicos, sendo incorporado o conhecimento da química e das ciências biológicas de forma a contribuir para o desenvolvimento da farmacologia e da terapêutica moderna (PEREIRA, 2013).

De acordo com Newman (2003), medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, podendo citar os que são usados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e anticancerígenos.

Em um país com imensa biodiversidade como o Brasil, muitas espécies da nossa flora são utilizadas de modo empírico, baseando-se na medicina popular, sem respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança, demonstrando que ainda existe uma enorme distância entre a disponibilidade de plantas e o estudo científico. Este fato se torna um grande incentivo ao avanço do estudo destas plantas (FOGLIO et al., 2006).

O Ministério da Saúde tem estimulado o uso de plantas e fitoterápicos. Em 2006, através da Portaria nº 971, o governo federal aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Ainda em 2006, aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do Decreto nº 5.813. Em 2008, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criado o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio da Portaria Interministerial nº 2960 (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2008).

A partir do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o Ministério da Saúde, elaborou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que contém 71 espécies com potencial terapêutico, para orientar a cadeia produtiva e o desenvolvimento de pesquisas e subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2009).

Pode ser observado um interesse crescente em torno dos fitomedicamentos, sendo justificado pelo fato de que estes revelam diversas vantagens, quando comparados à terapêutica convencional, apresentando uma menor incidência de efeitos colaterais, toxicidade relativa diminuída, baixo custo, além do Brasil apresentar uma enorme população de fitomedicamentos em sua flora nativa. As plantas medicinais podem representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a esses compostos, devido a variedade de mecanismos de atuação dos metabólitos (SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2006). Esses fatores podem ter influenciado a redescoberta da medicina natural, favorecendo um crescente número de pesquisas e estudos,

promovendo a fitoterapia que passa a ser respaldada por estudos, gerando uma relação direta entre medicina popular e o conhecimento científico, abandonando o empirismo.

É válido ressaltar que o uso de fitomedicamentos não está isento de riscos e a crença na “naturalidade inócua” dos fitoterápicos e plantas medicinais não é facilmente entendida, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso destas plantas dificilmente chegam ao conhecimento dos usuários (SILVEIRA et al., 2006). Há estudos que alertam para o risco de toxicidade de fitoterápicos e de seu uso indiscriminado pela população leiga (AGRA et al., 2007). Neste contexto, a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos seguem legislação específica, com necessidade de comprovação da eficácia e segurança, seguindo para registro na ANVISA o que é preconizado na RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e registro e a notificação de produto tradicional fitoterápico e a IN nº 4 de 18 de junho de 2014 que determina a publicação do guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (BRASIL, 2014; BRASIL, 2014).

Na odontologia, o uso da fitoterapia pelo cirurgião-dentista somente foi reconhecido e regulamentado como prática integrativa e complementar pela Resolução nº 082/2008 do Conselho Federal de Odontologia (CFO, 2008). Para tratar doenças bucais ou para o tratamento de doenças sistêmicas com manifestações bucais, a utilização de plantas medicinais ainda é pouco explorada (OLIVEIRA et al., 2007a). Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente devido à crescente busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010).

3.2.1 Sazonalidade

A produção dos metabólitos secundários, entre eles os óleos essenciais, representa uma resposta da planta às condições ambientais e genéticas a que está exposta (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Segundo os mesmos autores, a época do ano e o horário de coleta da planta podem influenciar no rendimento e na composição química do seu óleo essencial.

As variações climáticas sazonais, de forma mais intensa, e as flutuações climáticas diárias influenciam a produção dos metabólitos secundários. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente em que estão inseridas, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001; MORAIS, 2009).

Vários fatores abióticos têm sido relacionados às alterações na produção de metabólitos secundários, gerando alterações na quantidade e composição dos metabólitos de interesse. Dentre tais fatores, pode-se ressaltar a luminosidade, temperatura, água, altitude, nutrição, época e horário de colheita, bem como técnicas de colheita e pós-colheita (BARROS et al., 2009; MORAIS, 2009). Vale destacar também que estes fatores não atuam isoladamente, podendo apresentar correlações entre si, e assim, exercer influência conjunta no metabolismo secundário, como por exemplo: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem ocasionar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Além dos fatores abióticos, podem-se ressaltar as interações entre as plantas e microrganismos, insetos e outras plantas e ainda a idade e estágio de desenvolvimento (MORAIS, 2009).

A temperatura e a luminosidade apresentam papel relevante na fotossíntese, pois a interação destes fatores poderá garantir o ambiente ideal para este processo fisiológico (SOUZA et al., 2008). Apesar da adaptação das espécies ao seu habitat natural, os vegetais são capazes de resistir a grandes variações de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Na maioria das vezes, os óleos essenciais apresentam aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com elevada temperatura, mas em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva dos mesmos (MORAIS, 2009).

De acordo com Nascimento et al., (2006), ao longo do dia nota-se que o aroma característico de cada espécie torna-se mais acentuado, levando a acreditar que a concentração

de óleos essenciais voláteis seja maior naquele horário e, assim, maior o aroma. Assim a colheita torna-se o ponto crítico, pois é relevante que se defina o momento ideal para a mesma. Dessa forma, para alcançar melhores resultados a colheita deve coincidir o momento de maior expressão de princípio ativo, neste caso, dos óleos essenciais, com o momento de maior rendimento de fitomassa (MATTOS, 1996).

Segundo Martins e Santos (1995), existem horários em que a concentração dos princípios ativos na planta é maior, porém existe variação de espécie para espécie. De acordo com Silva et al. (2003), a presença de orvalho sobre as folhas pode reduzir os teores de óleo essencial devido ao aumento da umidade e assim, diminuição da quantidade de material a ser extraído. Já Fonseca et al., (2007) relatam que altas temperaturas podem ocasionar a volatilização do óleo essencial.

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade total de metabolitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos. Plantas mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários compostos, dentre estes, os óleos essenciais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; MORAIS, 2009).

Os efeitos da chuva na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de água do solo (EVANS, 1996). Já o estresse hídrico frequentemente tem consequências relevantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há diversos estudos de que estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundário (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Neste estudo, avaliamos a composição química, o rendimento e o teor de timol, componente majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* Cham., em relação as variáveis climáticas, temperatura máxima e mínima, umidade e insolação, durante o período de um ano.

3.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, orgânicos, lipofílicos, voláteis, aromáticos, também sendo conhecidos, como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. São extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). Domingo e López-Brea (2003) evidenciaram que as plantas produzem mais de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida das plantas. A atividade antibacteriana de muitas plantas deve-se aos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Tais produtos são conhecidos por suas substâncias ativas que possuem composição química complexa (NASCIMENTO et al., 2000). Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo importante papel na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizada. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011). Esses metabólitos têm sido amplamente empregados por suas propriedades observadas na natureza como agente antibacteriano, antifúngico e inseticida. Atualmente, aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes especialmente para as indústrias farmacêuticas, agrônômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser compostos por mais de 60 constituintes individuais, e isto interfere diretamente na sua maior ou menor atividade biológica (LIMA et al., 2006). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, onde normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas concentrações (traços) (SIMÕES et al., 2007). Cientificamente tem sido estabelecido que cerca de 60% desses compostos possuem propriedades antifúngicas e 35%, propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006; TRAJANO, 2008).

Os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas, mas também possuem alguma atividade antifúngica (OLIVEIRA, 2007b). Sua atividade antisséptica é normalmente atribuída à presença, além dos compostos fenólicos, de aldeídos, e álcoois, tais como o citral, geraniol, linalol e timol, que têm alto poder antisséptico, superior ao próprio fenol (FENNER et al., 2006). Os efeitos antimicrobianos são bastante conhecidos, porém seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nestes produtos, provavelmente sua atividade não é atribuída a um mecanismo específico, mas por diversas ações sobre a estrutura dos microrganismos (TRAJANO, 2008). De acordo com Burt (2004), dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular: o primeiro define que essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo-proteína; o segundo defende que pode haver uma interação direta de compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membrana. Outro ponto a considerar é que a presença de óleos essenciais interfere também com o mecanismo de reparo necessário para a divisão celular dos microrganismos. Sendo assim, pode-se dizer que os óleos essenciais agem contra os microrganismos atuando sobre sua membrana, promovendo sua ruptura (FARIAS; LIMA, 2000).

Guinoiseau et al. (2010) testaram os óleos essenciais de *Inula graveolens* L. e *Santolina corsica* Jordan et Fourr. frente a *S. aureus*, e observaram que a atividade bactericida de ambos os óleos não envolveu lise celular, porém a parede celular de algumas células bacterianas sofreu afinamento, e percebeu-se a perda da homogeneidade do conteúdo celular pela formação de grânulos citoplasmáticos. O óleo de coentro (*Coriandrum sativum* L.) exerceu efeitos sobre os processos respiratórios, bomba de efluxo e potencial de membrana de bactérias Gram-positivas e negativas, sendo bactericida para a maioria das linhagens testadas, muito provavelmente por ocasionar danos na membrana celular (SILVA et al., 2011).

De acordo com os estudos de Yengopal (2004a, 2004b, 2004c e 2004d), os óleos essenciais apresentam atividade bactericida contra microrganismos patogênicos orais e dentais e podem ser incorporados em lavagens ou enxaguatórios bucais para controle de infecção pré-procedimento, melhoria geral da saúde bucal, higiene interdental e para controlar o mal hálito.

Segundo Daferera et al. (2003), os óleos essenciais são compostos de origem natural que apresentam baixo risco para o desenvolvimento de resistência microbiana, possivelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, evitando a adaptação dos microrganismos.

Os óleos essenciais, como substâncias complexas, apresentam atividade maior do que seus compostos isolados. Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maior parte destas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas sozinhas. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente a determinados medicamentos, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (SIMÕES et al., 2009).

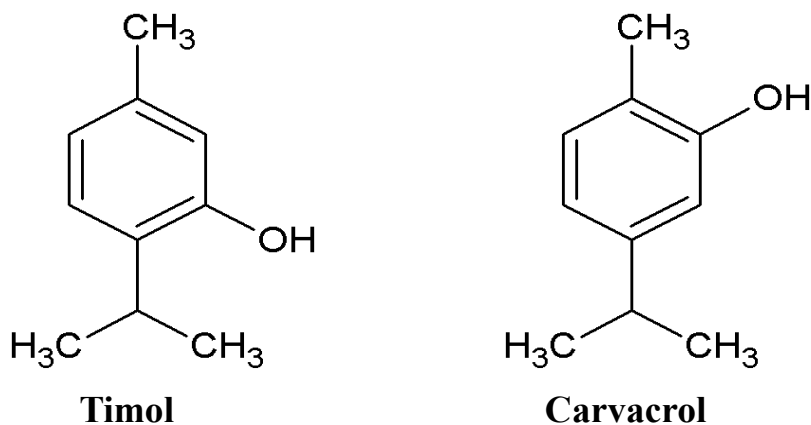
Combinações entre óleos essenciais de plantas diferentes podem alcançar o mesmo potencial descrito para óleos isolados, porém em menores concentrações, favorecendo o emprego como antimicrobianos de uso clínico. Essa a ação conjunta dos diferentes compostos químicos pode fornecer alternativa para o controle de bactérias multirresistentes. Tais informações são pontuadas por Gutierrez et al. (2008), que testaram combinações dos óleos essenciais de manjerição, erva-cidreira, manjerona, orégano, sálvia e tomilho contra bactérias de origem alimentar, obtendo os melhores resultados nas combinações de orégano com tomilho, manjerição e manjerona frente a *E. coli*. Já Fu et al. (2007) avaliaram o efeito de combinações entre os óleos essenciais de cravo e alecrim em três proporções (1:5, 1:7 e 1:9), sendo observado atividade aditiva (frente *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Proteus vulgaris*), sinérgica (frente *Candida albicans*) e antagônica (frente *Aspergillus niger*).

Diversos estudos buscam um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menores toxicidade, custo e índice de resistência bacteriana (ALVARENGA et al., 2007), justificando o crescente interesse científico sobre a ação dos óleos essenciais. Edris (2007) menciona a preocupação com o aparecimento de microrganismos multirresistentes em ambientes hospitalares e na comunidade e as implicações no tratamento dos pacientes e controle de infecções, sugerindo-se a aplicação desses componentes para tal fim.

3.3.1 Considerações sobre *Lippia sidoides* Cham

A *Lippia sidoides* Cham. é um arbusto medicinal com altura média de 3 m (Figura 3), pertencente à família *Verbenaceae* nativa do nordeste brasileiro, sobretudo nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte e do norte de Minas Gerais, conhecida popularmente como “alecrim-pimenta” (ALMEIDA et al., 2010; MARTINS et al., 2002; COSTA et al., 2002). O gênero *Lippia* possui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, destacando-se pelo aroma forte e agradável, além do seu aspecto atrativo na época da floração (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2002) (Figura 4). O óleo essencial extraído dessa planta, apresenta em sua composição cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol (Figura 2), ambos agentes antimicrobianos, além de outros componentes químicos como flavonoides e quinonas (LORENZI e MATOS, 2002). De acordo com Pascual et al. (2001), na maioria dos casos, as partes da planta utilizadas são as folhas, as partes aéreas e as flores e são normalmente preparadas como infusão e decocção e administradas oralmente.

Figura 2 - Estrutura química do timol e carvacrol.



Fonte: Própria autora

A *L. sidoides* Cham. (Figuras 3 e 4) é bastante utilizada na medicina popular brasileira devido à sua ação antimicrobiana, sendo usada como agente anti-infeccioso, principalmente para infecções de garganta, gastroentéricas, da pele e couro cabeludo (COSTA et al., 2001). De acordo com Girão et al. (2003), existem evidências populares e científicas que sugerem que o óleo essencial desta espécie pode ser útil para higiene oral e na prevenção de problemas dentários como cáries e gengivites. Também foram relatadas atividade moluscida

(CAVALCANTI et al., 2010) e larvicida contra *Biomphalaria glabrata* e *Aedes aegypti* (MATOS e OLIVEIRA, 1998 e CAVALCANTI et al. 2004).

De acordo com a monografia da planta elaborada pelo Ministério da Saúde em 2014 e atualizada em 2018 através da publicação “Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS (*Lippia sidoides* Cham., *Verbenaceae* – alecrim-pimenta)” diversos estudos foram compilados a respeito da citotoxicidade e toxicidade aguda e subcrônica da planta. Importante ressaltar que esses estudos diferem em relação a apresentação da planta, podendo ser avaliado o extrato hidroalcoólico, metanólico ou óleo essencial, sendo também testadas concentrações diferentes. Quanto à toxicidade crônica e genotoxicidade, não foram encontrados dados na literatura consultada (BRASIL 2014; BRASIL, 2018).

No estudo de Borges et al. (2012), o resultado do ensaio de MTT considerou o óleo essencial nas concentrações de 15,6 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de baixa toxicidade frente a células mamíferas (macrófagos peritoniais de camundongos). Mota (2009) verificou que para a mesma linhagem celular o óleo essencial não inibiu o crescimento em concentrações abaixo de 0,5 mg.mL^{-1} . Os constituintes timol e carvacrol apresentaram toxicidade superior ao OE em macrófagos peritoniais (MEDEIROS et al., 2011a). No entanto, outro estudo com as mesmas concentrações considerou tanto o OE quanto seu constituinte timol como relativamente tóxico (MEDEIROS et al., 2011b). A toxicidade do extrato metanólico das folhas de *L. sidoides* Cham. frente a larvas de *Artemia salina* também foi testada, sendo observado valores de $\text{CL}_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato e 1,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o timol na forma isolada (FABRI et al., 2011).

Quanto à toxicidade aguda, estudos com o óleo essencial obtido das folhas administrados em dose única via oral, em camundongos, foram observados valores de DL_{50} que variaram de 0,1 a 7,1 g.kg^{-1} (MOTA, 2009; FONTENELLE, 2008 e SANTOS, 2005). Em relação à toxicidade subcrônica, camundongos receberam por via oral, em um período de 30 dias, o óleo essencial das folhas na dose de 117,95 mg/kg/dia . No final do período foram coletadas amostras de sangue e, após análise, chegou-se a conclusão que a administração subcrônica do óleo essencial não apresentou toxicidade. Os animais não tiveram seu peso corporal afetado pelo tratamento e os parâmetros bioquímicos analisados, creatinina, ureia e TGO e TGP, não foram significativamente alterados. Além disso, a avaliação histopatológica

do fígado, rins, pulmões, coração e baço não revelou alterações na estrutura padrão dos tecidos estudados (FONTENELLE, 2008; FONTENELLE et al., 2007 e SANTOS, 2005).

Diversos estudos comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial e de extratos de *L. sidoides* Cham. contra diversas bactérias, fungos e outros microrganismos (LEMOS et al. 1990, BOTELHO et al. 2007a; FONTENELLE et al. 2007, CAVALCANTI et al. 2010, entre outros). Há relatos de outras atividades do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. como antiespasmódico, sedativo, anti-hipertensivo e anestésico local (PASCUAL et al. 2001).

De acordo com Matos e Oliveira (1998), as formas farmacêuticas recomendadas para o uso desta planta são o infuso, a tintura, a solução do óleo essencial, o sabão líquido preparado com a tintura e a pasta dentifrícia. As quatro primeiras são utilizadas topicamente como solução anti-séptica e ação preventiva e curativa de infecções por vários tipos de bactérias e microfungos. A última é preventiva da cárie dental. Em compressas locais, a tintura pode ser usada, pura ou diluída, para tratamento de pequenos ferimentos na pele ou nas mucosas, afecções do couro cabeludo e, também, como desodorante permanente de axilas e pés; essas preparações são muito eficientes no tratamento tópico da acne, sarna infectada, panos brancos, impingens, caspa e *tinea caput*.

Dentre as plantas utilizadas com propósitos medicinais, o alecrim pimenta está incluído na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, a RENISUS, publicada em 2009 pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011 e BRASIL, 2009).

Figura 3 - Imagem de *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim pimenta).



Fonte: Próprio autor

Figura 4 - Imagem de *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim pimenta). Floração.



Fonte: Próprio autor

3.3.2 Considerações sobre *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Cymbopogon citratus (DC) Stapf é uma espécie originária da Índia e largamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde é conhecido popularmente como capim-limão, capim-cidreira entre outros, dependendo da região. Pertence à família Poaceae e se apresenta como uma erva perene, que forma touceiras compactas e robustas de até 1,2 m de altura, com rizoma semi-subterrâneo (Figura 5). As condições climáticas ideais para o seu desenvolvimento são calor e clima úmido com plena exposição solar e chuvas uniformemente distribuídas (ORTIZ et al., 2002). O chá das folhas da espécie é usado tradicionalmente para

nervosismo, febre, tosse, dores diversas (dor de cabeça, abdominais, reumáticas) e alterações digestivas como dispepsia e flatulência. O *Cymbopogon citratus* está incluído no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011). Apresenta grande importância econômica devido à produção de seu óleo essencial, rico em citral e amplamente utilizado na indústria de alimentos e cosméticos (EKPENYONG et al., 2015; COSTA, et al., 2005).

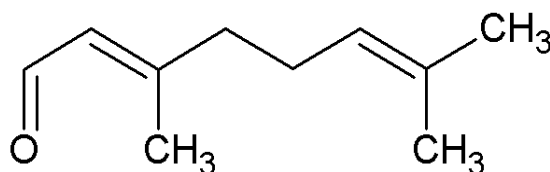
Figura 5 – Imagem de *Cymbopogon citratus* (Capim-limão).



Fonte: <http://pelahorta.com.br/?product=capim-limao-capim-cidreira>

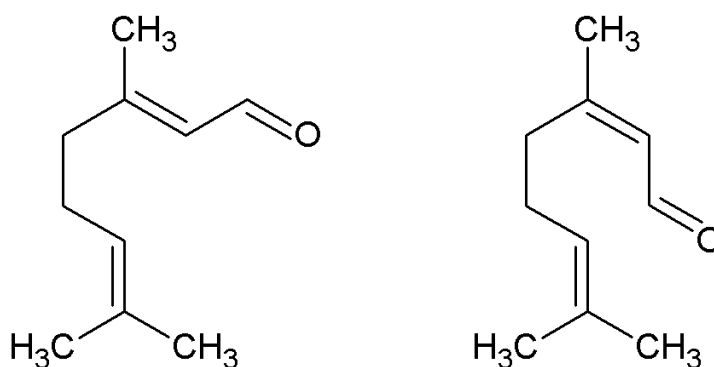
Das folhas frescas extraí-se por arraste a vapor um óleo essencial de cor amarela, sabor picante e aroma agradável (ALMEIDA, 1993). O óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf extraído por arraste a vapor apresenta como componente majoritário o citral (Figura 6) que é uma mistura dos isômeros geranial (trans-citral) e neral (cis-citral) (Figura 7), responsável por aproximadamente 70% de sua composição (BAKKALI et al., 2008). Foi identificado que o óleo essencial de capim-limão apresenta propriedades antidepressivas, antioxidantes, anti-sépticas, sedativas, bactericidas e fungicidas (GARDNER, MCGUFFIN, 2013). Além disso, estudos têm sido realizados sobre o uso do óleo essencial, sendo citadas ações como repelentes contra insetos (TRONGTOKIT et al., 2005), larvicidas (SOSAN et al., 2001) e atividades antimicrobianas e antioxidantes na conservação de alimentos (BURT, 2004).

Figura 6 - Estrutura química do citral.

**Citral**

Fonte: Própria autora

Figura 7- Estrutura química do geranial e neral.

**Geranial****Neral**

Fonte: Própria autora

Estudos relataram o efeito antibacteriano do óleo de capim-limão contra uma gama diversificada de organismos, compreendendo gram positivos e gram negativos, levedura e fungos (EKPENYONG et al., 2015). Onawunmi et al. (1984) observaram que os organismos gram-positivos eram mais sensíveis ao óleo que organismos gram negativos, assim como também observado por Naik et al. (2010). O óleo essencial de *C. citratus* demonstrou atividade contra patógenos comuns do trato respiratório, como *Aspergillus spp*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (AL-YOUSEF, 2013; INOYE et al., 2001) e também apresentou atividade contra *Candida albicans*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi* e *Shigella sonnei* (ADESEGUN et al., 2013; ABE et al., 2003; INOYE et al., 2001). As atividades antifúngicas do óleo de *C. citratus* podem ser atribuídas à presença de certo número de constituintes, incluindo citral, β -mirceno, linalol e geraniol (DI

PASQUA et al., 2006; ALVIANO et al., 2005). Estes compostos foram testados isoladamente como no caso do trabalho de Ferreira et al. (2009), que estudaram a atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados, onde de acordo com os testes foi constatada atividade antifúngica em 100% das leveduras selecionadas no estudo (32 cepas de *C. albicans*, 25 de *C. tropicalis*, 20 de *C. parapsilosis* e 5 de *C. glabrata*), sendo a *C. albicans* a espécie mais sensível em relação às não-*albicans* frente ao citral.

Em relação à toxicidade de *C. citratus*, Fandohan et al. (2008) descreveram em seu estudo a atividade tóxica aguda e subaguda do óleo essencial de capim-limão. Nos experimentos de toxicidade aguda, ratos Wistar que receberam o OECC na dose de 5-1500 mg.kg⁻¹ não demonstraram anormalidade no comportamento geral ou morte no primeiro dia, sendo esse resultado semelhante ao grupo controle. No entanto, em doses mais altas, a partir de 2000 mg.kg⁻¹, foram observadas algumas anormalidades comportamentais, e histológicas no fígado e estômago. A partir de 3000 mg.kg⁻¹, foi observada alta taxa de mortalidade. Já nos estudos subagudos o OECC foi administrado por 14 dias e os animais que receberam até 500 mg.kg⁻¹ de OE apresentaram comportamento normal, enquanto várias anormalidades no comportamento foram observadas a partir de 1000 mg.kg⁻¹ e, na dose de 1500 mg.kg⁻¹, os animais morreram em até quatro dias. A dose letal média (DL₅₀) em ratos foi de 3250 mg.kg⁻¹ de peso corporal.

3.3.3 Considerações sobre *Citrus limon* (L.) Burm. f. (pro. sp.)

O *Citrus limon* (L.) Burm. f. (pro. sp.) pertence à família Rutaceae e tem sua origem proveniente da região sudeste da Ásia (LORENTE et al., 2014). A família Rutaceae possui aproximadamente 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (CORTEZ et al., 2006). *Citrus limon* (L.) Burm. f. (pro. sp.) é uma planta do norte e nordeste do Brasil, conhecida popularmente como limão siciliano, limão verdadeiro, limoeiro, entre outros, cujas folhas e frutos são aproveitados pela medicina popular para diversos fins terapêuticos (SANTOS, 2016; CARVALHO et al., 2013; SÁ et al., 2012; SIMÕES et al., 2003). Possui cor amarela em seu estágio de maturação, casca grossa, superfície levemente rugosa e uma protuberância característica (SANTOS, 2016) (Figuras 8 e

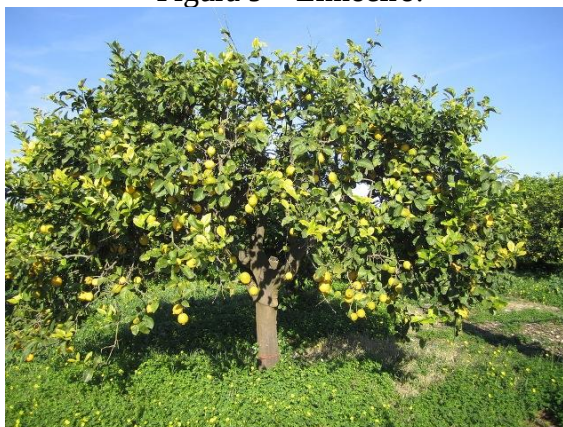
9). Apresenta atividade anticancerígena, potencial antibacteriano (KUMARI, 2014), presença de compostos fenólicos e antioxidantes naturais (HAJIMAHMOODI et al., 2014).

Figura 8 - *Citrus limon* (Limão siciliano).



Fonte: <https://www.natures-health-foods.com/citruslimon.html>

Figura 9 – Limoeiro.



Fonte: http://www.fruitipedia.com/lemon_citrus_limon.htm

Conhecido principalmente pelo alto teor de vitamina C, todas as partes do limão siciliano são utilizadas, sendo empregadas na culinária, medicina alternativa, indústria farmacêutica e alimentícia. Da casca, retira-se uma essência aromática, normalmente obtida por prensagem da casca do fruto, sendo usada em perfumaria e no preparo de licores e sabões (MATOS, 2007), devido seu aroma agradável de “limão fresco”. Já as folhas são tradicionalmente usadas na cultura popular no preparo de chás e águas de banhos e do suco do fruto obtém-se bebidas refrescantes, molhos com sabor acentuado, dentre outros. Seu óleo essencial se apresenta como um líquido amarelado, cujo componente majoritário é o limoneno (Figura 10). Quando verdes, são mais ricos em óleo essencial, e sua espremedura manual ainda produz um óleo de melhor qualidade que os métodos mais recentes de destilação. O fruto

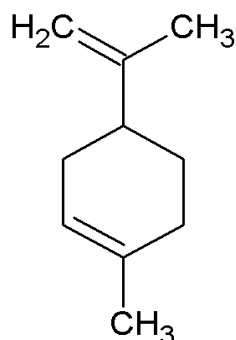
também é rico em ácido cítrico, málico e oxalílico, além de vitamina C, que atua no metabolismo do cálcio, particularmente durante a gravidez e apresenta enorme eficácia sobre o escorbuto, estomatites e periodontopatias (ALMEIDA, 1993; SELLAR, 2002).

O óleo essencial de *C. limon* apresenta em sua composição, muitos componentes que podem atuar de maneira isolada ou em associação, sendo, assim, responsáveis por sua maior ou menor atividade biológica. São eles: monoterpenos (α -thujene, α e β -pineno, canfeno, mirceno, α e β -felandreno, α e γ -terpinene, limoneno, terpinoleno, β -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endo-fenhol, cânfora, citronelol, borneol, terpin, α -perilla álcool, terpineol, nerol, neral, carvona, geraniol, geranial, citronelol, cadineno, timol); sesquiterpenos (σ -elemeno, E-caryophellene, α -trans-bergamoteno, α -humuleno, E- β -farneseno, γ -curcumenol, valencene, biciclogermacreno, α -muurolene, α e γ -bisaboleno); sesquiterpenos oxigenados (álcool caryophellene, germacreno, α -muurolol, α -cadinol, α -bisabolol, E-farnesol); e outros componentes oxigenados, como o ácido palmítico e ácido linoléico (FERHAT et al., 2007; LOTA et al., 2002)

Na medicina popular, várias atividades terapêuticas são descritas: adstringente, alcalinizante do sangue e da urina, antianêmica, antibiótica, antisséptica, antiemética, antidepressiva, antiescorbútica, antiinflamatória, antiespasmótica, antitérmica, bactericida, diaforética, depurativa, diurética, expectorante, sedativa, sudorífera e vermífuga (AGRA et al., 2007; FENNER et al., 2006; PENIDO, 2007; REZENDE; COCCO, 2002; VENDRUSCOLO et al., 2005; VIEIRA, 1992).

Na Odontologia, existem relatos a respeito dos benefícios de *C. limon*, como seu uso para tratamentos de gengivite e úlceras bucais (SANDHU; HEINRICH, 2005). Devido suas ações antisséptica, antimicrobiana, anti-inflamatória, o uso terapêutico de *C. limon* na odontologia, pode ser de grande importância, motivando mais estudos sobre os ativos deste fruto que comprovem o seu uso efetivo nas afecções orais.

Figura 10 - Estrutura química do limoneno.



Limoneno

Fonte: Própria autora

3.4 Formas farmacêuticas para cavidade bucal

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, forma farmacêutica é o estado final de apresentação dos princípios ativos farmacêuticos após uma ou mais operações farmacêuticas executadas com a adição ou não de excipientes apropriados a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas a uma determinada via de administração.

Diversas formas farmacêuticas foram desenvolvidas para facilitar à administração de medicamentos a pacientes de faixas etárias diferentes ou em condições especiais, permitindo seu melhor aproveitamento. Além disso, a forma farmacêutica está relacionada à via de administração que vai ser utilizada e o tipo de ação esperada.

As formas farmacêuticas mais utilizadas para preparação de produtos odontológicos são: líquidos (enxaguatórios, xaropes e suspensões), semi-sólidos (géis, espuma ou mousse, pastas) e sólidos (APPEL; RÉUS, 2005). Para patologias da cavidade bucal, usam-se principalmente enxaguatórios bucais, colutórios, pomadas, géis, sprays e orabase.

Os enxaguatórios ou bochechos que são amplamente utilizados, apresentam como vantagens a fácil aplicação e boa aceitação, porém como desvantagens podemos citar o contato direto com os tecidos moles, a diminuição da eficácia devido a ação da saliva, o tempo reduzido na cavidade bucal e a possibilidade de toxicidade por deglutição. Já os dentifrícios apresentam

também fácil aplicação e boa aceitação na rotina de higienização, podendo ser usado diariamente, no entanto, dependem da habilidade do paciente na execução da escovação para ser eficaz. As espumas se apresentam como uma formulação leve e aerada que favorece o espalhamento do produto na cavidade bucal, podendo alcançar espaços de difícil acesso entre os dentes. Estão disponíveis espumas contendo flúor com apresentações mais voltadas para as crianças, além de produtos com a finalidade de clareamento dos dentes que podem ser utilizadas com ou sem o auxílio de moldeiras ou escovas dentais.

Nos produtos destinados ao controle químico do biofilme dental, diversas apresentações estão disponíveis, tendo como agentes antimicrobianos principalmente a clorexidina e o triclosan. O objetivo da terapêutica antimicrobiana para o controle do biofilme dental não deve ser baseado na eliminação completa dos microrganismos, mas sim na troca ecológica de um biofilme cariogênico por um não cariogênico (CAUFIELD et al., 2000).

O digluconato de clorexidina é um antisséptico de amplo espectro de ação, agindo contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos, vírus e leveduras, além de possuir alta substantividade, apresentando liberação durante 12 horas, sendo considerado o padrão-ouro para utilização *in vitro* e *in vivo* (ZANATTA; RÖSING, 2007). Assim, a clorexidina é usada como antisséptico eficaz contra a colonização por microrganismos na cavidade bucal, cuja ação contra o crescimento bacteriano é determinada pela alteração na adesão bacteriana ao dente, e pela alteração da parede celular bacteriana (SNYDERS; KHONDOWE, 2011). A concentração da clorexidina para uso na cavidade bucal pode variar entre 0,12%, 0,2% e 2%, sendo a maior concentração (2%) associada a melhores efeitos antibacterianos, porém em concentrações mais elevadas ou em uso contínuo está mais relacionada ao aparecimento de efeitos adversos como alteração no paladar, manchamento dentário e irritação dos tecidos, entretanto apresenta em concentrações menores ou igual a 0,25% um efeito menos agressivo (ZANATTA; RÖSING, 2007).

O triclosan [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol] é um agente antimicrobiano sintético de amplo espectro que se tornou um dos aditivos mais comumente usados em uma ampla gama de produtos de consumo, incluindo sabonetes, cosméticos, produtos terapêuticos e plásticos, expondo a população através do uso desses produtos de cuidados diários, além da contaminação da água. O uso do triclosan está associado a muitos efeitos sobre a saúde e o meio ambiente,

incluindo desregulação endócrina e prejuízos na contração muscular, além dos efeitos nos ecossistemas aquáticos (YUEH et al., 2014). Apesar de seu amplo e diversificado uso, em setembro de 2016, a *Food and Drug Administration* (FDA), anunciou que até setembro de 2017 todos os produtos cosméticos anti-sépticos contendo Triclosan deveriam ser retirados do mercado dos Estados Unidos.

Os produtos naturais também podem ser utilizados como agentes antimicrobianos em produtos odontológicos. A partir do óleo essencial de *L. sidoides* Cham., são descritas na literatura diversas formas farmacêuticas e formulações para aplicação na cavidade bucal, tendo sido compiladas na Monografia da planta elaborada pelo Ministério da Saúde (2014). Neste documento são descritas as seguintes apresentações: colutório bucal e enxaguatório bucal à base de OE, gel bucal e gel-creme contendo OE.

3.5 Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica que consiste no revestimento de partículas, gotículas ou gases, permitindo a liberação do seu conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (TRAJANO, 2012; GOUIN, 2004). O processo de microencapsulação envolve também a função de separar materiais reativos, diminuir a toxicidade de algum composto ativo, mascarar odor ou sabor de certas substâncias, reduzir a volatilidade de líquidos, estender o prazo de validade, controlar a liberação do ativo, fazendo com que ele seja liberado de forma gradual ou em um local específico do organismo. A principal finalidade desta técnica é proteger compostos ativos sensíveis, como é o caso dos compostos voláteis e termolábeis, em uma matriz sólida, reduzindo a evaporação e o contato com o ar atmosférico, umidade e a luz, protegendo contra degradação e aumentando a vida de prateleira, aumentando sua estabilidade. O processo de microencapsulação pode promover a liberação do princípio ativo de forma mais lenta, podendo favorecer a terapêutica por redução da dose e da frequência de administração quando comparado a fármacos tradicionais. A microencapsulação de óleos essenciais tem o objetivo de retardar a evaporação dos núcleos voláteis (NIEDDU, 2014; TRAJANO, 2012).

A microcápsula é formada por duas partes, sendo o núcleo onde se encontra o ativo e a parede, que também pode ser chamada de membrana ou cápsula que é formada pelo polímero

encapsulante que envolve e protege o material do núcleo (MARTINS, 2012). O tamanho de uma partícula pode variar de alguns milímetros até < 1 mm, podendo ser classificada em nano ($< 0,2 \mu\text{m}$), micro ($0,2$ a $5000 \mu\text{m}$), ou macropartículas ($> 5000 \mu\text{m}$) (RÉ, 1998). A forma também pode ser bastante variável em função do método e do agente encapsulante utilizados na preparação (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Vários métodos são usados para a preparação de microsistemas, que podem envolver micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões. Para encapsular compostos lipofílicos, o material usado deve estar adequado para esta finalidade, devendo possuir alta atividade emulsificante, alta estabilidade, uma tendência a formar matriz fina e densa durante a secagem e durante a desidratação não deve permitir a separação do lipídeo da emulsão formada. Polímeros como maltodextrina, goma arábica e proteínas são indicados para serem utilizados como agentes encapsulantes de materiais lipídicos, como óleos essenciais (TRAJANO, 2012; MARTINS, 2012; JAFARI et al., 2008).

A escolha do material de parede é uma etapa crítica, pois poderá influenciar as propriedades da emulsão antes do processo de secagem, na retenção dos componentes voláteis durante a secagem e a vida útil do pó após a secagem (JAFARI et al., 2008). Assim, o material de parede deve ser, pelo menos, parcialmente solúvel em água, devendo possuir boas propriedades de emulsão/estabilização, capacidade de formar filme e ser capaz de formar soluções pouco viscosas, mesmo quando em altas concentrações. Além disso, o material de parede não deve ter reatividade com o material a ser microencapsulado, deve ser facilmente manipulado e proteger o ingrediente ativo de fatores externos e permitir a liberação do produto no momento e local desejado (TRAJANO, 2012; GOUIN, 2004).

Diferentes polímeros podem ser utilizados, de modo que haja uma liberação controlada do material nuclear (CANO-HIGUITA et al., 2015). Esses polímeros podem ser usados como misturas de dois ou mais materiais sintéticos ou naturais. Alguns materiais que podem ser usados como agentes encapsulantes são: amido, celulose, maltodextrina (MD), ciclodextrinas, quitosana, alginato, lipídios (cera, parafina, mono e diglicerídeos), óleos hidrogenados, gorduras, materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos), proteínas (glúten, caseína, gelatina e albumina), polivinilpirrolidona (PVP), hidroxipropilcelulose (HPC),

hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose de sódio (NaCMC), entre outros (CANO-HIGUITA et al., 2015; MARASINI et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; MATTÉ, DA ROSA, 2013).

Uma das vantagens do processo de microencapsulação é a diminuição do uso de aditivos, no caso de alimentos, e de muitos excipientes, no caso de medicamentos. Porém, como desvantagem pode ocorrer interação entre o núcleo e a membrana encapsulante. Além disso, o tamanho da partícula contida no núcleo e o grau de viscosidade do agente encapsulante também podem interferir na liberação do material do núcleo (MARTINS, 2012).

Para a formação das microcápsulas, diversos métodos podem ser empregados, podendo ser divididos em: métodos físicos que incluem o *spray drying*, a pulverização em banho térmico, o leito fluidizado, a extrusão, a centrífuga com múltiplos orifícios, a co-cristalização e a liofilização; métodos químicos que compreendem a inclusão molecular, e a polimerização interfacial e os métodos físico-químicos que incluem a coacervação, separação por fase orgânica, a pulverização em agente formador de reticulação, e o envolvimento lipossômico (KANAKDANDE et al., 2007).

A liofilização é uma técnica de secagem eficaz que não prejudica a estrutura básica dos materiais, usando como princípio o fenômeno físico da sublimação do solvente sob vácuo. Nesse processo, a umidade é removida após o congelamento do solvente (ANNIE et al., 2016). Na liofilização uma das vantagens é a temperatura muito baixa utilizada no processo, pois permite que substâncias voláteis sejam liofilizadas com uma menor volatilização do seu conteúdo e perda mínima durante o processo. Uma desvantagem é que, dependendo do tipo de material, a secagem pode requerer muito tempo (MORAIS et al., 2016).

Um ciclo típico de liofilização consiste em três etapas. A primeira etapa é o congelamento, seguido da secagem primária e da secagem secundária. Na primeira etapa, o líquido é resfriado e com o congelamento os sólidos se tornam mais concentrados no líquido restante. É uma etapa fundamental, pois determina a formação, o tamanho e a conexão entre os poros, que determinam a troca de calor. A secagem primária começa quando a pressão é reduzida para valores abaixo da pressão de vapor de gelo e a temperatura da prateleira aumenta

a fim de fornecer o calor latente removido por sublimação de gelo. Durante a secagem secundária, a água residual é removida para reduzir o teor de umidade para um nível ideal para estabilidade, uma vez que mesmo após a sublimação durante a secagem do produto ainda contém 10-35% de água ligada (MORAIS et al., 2016).

3.6 Estudo de caracterização dos óleos essenciais

3.6.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com excelente poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra, com sensibilidade que permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas. A fase estacionária da cromatografia gasosa propicia a separação da mistura através de processos físicos e químicos como diferenças de solubilidade e volatilidade. A fase móvel é um gás, denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna de separação até o detector, onde os compostos separados são detectados. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de componentes presentes em misturas orgânicas ou bioquímicas complexas (COLLINS, 2006). Esta técnica permite a separação dos constituintes que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. Para cada constituinte, é obtido um espectro de massas, indicando a massa molecular e o seu padrão de fragmentação (TAVARES et al., 2005; AQUINO NETO, 2003). A partir do padrão de fragmentação pode ser feita eletronicamente a comparação com os padrões constantes na biblioteca de espectros de massas, sendo possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos.

3.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção dos espectros de ressonância, a amostra é submetida a um campo

magnético externo, de forma que determinados núcleos que apresentam um momento magnético nuclear (núcleos com número de massa ímpar como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo) podem entrar em ressonância com a radio frequência aplicada, absorvendo a energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química. Os dados obtidos com esse método espectroscópico são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente todas as classes de produtos naturais, incluindo os metabolitos secundários vegetais. Os espectros de RMN de próton (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção da energia eletromagnética. A grande variedade de técnicas disponíveis de RMN (COSY, NOESY, HETCOR, HMBC, INEPT, INADEQUATE, COLOC, entre outras) permite identificar a proximidade especial ou mesmo a conectividade de alguns átomos em particular, auxiliando dessa maneira, na montagem dos compostos constituídos pelas diferentes partes da molécula (SIMÕES et al., 2007).

Santos et al. (2004), utilizaram a espectroscopia de RMN para confirmar as identificações dos componentes anteriormente determinados por CG-EM. As amostras de óleo de *Lippia origanoides* H.B.K. foram analisadas por CG-EM e RMN ^1H e RMN ^{13}C , mostrando uma composição química similar. A identificação foi realizada por análise assistida por computador do espectro de RMN ^{13}C do óleo total, sem fracionamento prévio, e comparando os sinais obtidos com os de compostos puros incluídos numa biblioteca. Cada composto foi identificado inequivocamente devido ao número de carbonos identificados, o número de sinais sobrepostos e a diferença do deslocamento químico de cada ressonância no espectro da mistura e na referência.

Para promover a investigação química dos extratos etanólicos de caules, raízes e folhas de *Lippia sidoides*, Almeida et al. (2010) utilizaram de técnicas espectrais para determinação das substâncias isoladas, sendo suas estruturas caracterizadas com base em dados espectrais, principalmente RMN ^1H e RMN ^{13}C (1D e 2D) e espectros de massa.

3.7 Avaliação de produtos odontológicos e princípios ativos

3.7.1 Atividade antimicrobiana

A cavidade bucal apresenta um universo diversificado de espécies microbianas, sendo favorável para colonização em superfícies dentárias, língua e mucosa oral (GHARECHAHÍ *et al.*, 2012; MARSH, 2012). A microbiota natural é necessária para o desenvolvimento fisiológico da cavidade bucal (MARSH, 2005), sendo assim, novos produtos antimicrobianos, contendo produtos naturais, como OE, devem restaurar o equilíbrio da microbiota bucal e não eliminá-la por completo da boca, sendo capaz de manter os níveis das bactérias cariogênicas ideais a saúde.

A *Candida albicans* é um dos patógenos oportunistas mais comuns que vive comensalmente na cavidade oral humana. No entanto pode trazer grandes malefícios, principalmente em pacientes imunossuprimidos, com câncer, que passaram por processo de transplante ou que ficaram hospitalizados durante um longo período, podendo causar infecção superficial das mucosas ou contribuir no agravamento de doenças sistêmicas. Na cavidade bucal, pode ser responsável por candidíase orofaríngea e por outras doenças como estomatite em pacientes que utilizam prótese. As infecções por *C. albicans* vêm aumentando nos últimos anos, além das candidíases superficiais e sistêmicas (BELATO *et al.*, 2018; NIKOLIĆ *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2010). A capacidade de *C. albicans* de formar biofilme é de interesse clínico, já que essas comunidades são mais resistentes à ação de certos agentes antifúngicos e defesas naturais do hospedeiro (FU *et al.*, 2014).

O *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, pode ser considerado um agente patogênico relacionado a infecções e como um importante problema de saúde pública (BELATO *et al.*, 2018). O *S. aureus* está ligado a casos de periodontite, biofilmes na gengiva e infecções causadas pelo uso de implantes. Além das infecções causadas pelo *S. aureus*, em especial no âmbito hospitalar, ele também é capaz de produzir toxinas e causar intoxicações alimentares. Dentre os problemas mais graves estão a osteomielite, endocardite, pneumonia e septicemia, além de outras manifestações clínicas, incluindo doenças de pele e lesões dos tecidos moles (BELATO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os biofilmes de *C. albicans* e de *S. aureus* podem se unir e formar um biofilme heterotípico. Os biofilmes de *C. albicans* também ajudam no desenvolvimento de biofilmes de *S. mutans*, fazendo uma associação direta e produzindo cáries (NIKOLIĆ *et al.*, 2014).

Streptococcus mutans, bactéria gram-positiva, é um dos patógenos causadores da cárie dentária, sendo responsável pela indução de perda mineral, devido à forte adesão à superfície

dental, desmineralização da hidroxiapatita e geração de ácidos da degradação de carboidratos fermentáveis provenientes da dieta. Portanto, o controle da cárie pode ser favorecido com a redução dos níveis desse microrganismo na cavidade bucal (PAULA et al., 2010).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que está relacionada à infecções hospitalares em todo o mundo. Frequentemente estas infecções são difíceis de tratar devido à resistência dessa espécie, bem como a sua notável capacidade de adquirir mecanismos adicionais de resistência a múltiplos grupos de agentes antimicrobianos (STRATEVA e YORDANOV, 2009). *P. aeruginosa* é um agente patogênico oportunista que pode causar infecções do trato urinário, no sistema respiratório, na pele e nos tecidos moles, infecções oftalmológicas, além de outras infecções sistêmicas. Esta bactéria permanece como um dos mais prevalentes agentes das infecções hospitalares, pela habilidade que possui de se desenvolver no próprio ambiente hospitalar, como no ar, em reservatórios de água e outros fluídos, e em superfícies inanimadas que cercam o paciente, proporcionando focos de contato e de transmissão (OLIVEIRA et al., 2007c). Está associada com frequência à infecções em pacientes imunossuprimidos internados em unidades de terapia intensiva (UTI), devido à necessidade de se expor constantemente a procedimentos invasivos, como utilização de cateteres, sondas, instrumentos e dispositivos de ventilação mecânica. Em pacientes imunossuprimidos a *P. aeruginosa* também está associada à osteomielite mandibular por disseminação intraóssea e a lesões necróticas da mucosa oral. A cavidade oral pode servir de reservatório para *P. aeruginosa* e, em pacientes debilitados, idosos e imunocomprometidos, as infecções causadas pelo patógeno representam um importante problema de saúde (SOUZA et al., 2018).

Plantas medicinais podem ser fontes de compostos químicos antimicrobianos com aplicação odontológica, uma vez que estes compostos naturais podem minimizar efeitos prejudiciais com manutenção da eficácia terapêutica, ressaltando a importância de se conhecer e avaliar a atividade antimicrobiana desses compostos.

Para avaliação da atividade antimicrobiana, diversas técnicas podem ser utilizadas, incluindo a difusão em ágar, a macrodiluição e microdiluição, sendo também possível avaliar o sinergismo potencial de duas substâncias pelo método de microdiluição por checkerboard.

O teste de difusão em ágar, ou também conhecido como difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância que possivelmente pode inibir seu crescimento, em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância testada (OSTROSKY et al., 2008). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana a ser testada no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003), sendo um dos mais utilizados o método de disco-difusão, também conhecido como teste de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966).

Inicialmente o microrganismo teste é semeado de forma uniforme por toda a superfície de um meio de cultura solidificado em placa de Petri. O inóculo deve ser padronizado, utilizando a escala de McFarland. Os discos de papel filtro são então impregnados com quantidades conhecidas da substância teste e colocados sobre a superfície do meio que havia sido semeado (COLLINS, 1964). A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008).

No método de diluição em caldo é considerada a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância que está sendo testada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. (PINTO et al., 2003).

Para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) ou a Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998 e apresenta vantagens como maior sensibilidade que outras técnicas, quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados, além de ter baixo custo (OSTROSKY et al., 2008). Na microdiluição são usadas microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Devem ser determinados um controle positivo e um negativo e preparar soluções com concentração decrescente da substância teste.

Entre as técnicas empregadas na avaliação laboratorial da combinação de dois antimicrobianos, a mais usada é a técnica do *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) que consiste em buscar a concentração inibitória fracionada (CIF), empregando uma metodologia similar à utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). (RAND et al., 1993; MARQUES et al., 1997; LORIAN 2006; PETERSEN et al., 2006; TONG et al., 2006), sendo de fácil interpretação, cujo cálculo e resultados são simples, requerendo materiais comumente disponíveis em laboratórios de microbiologia (LORIAN, 2006).

O termo *checkerboard* se refere ao padrão de diluição dos antimicrobianos distribuídos na placa de microdiluição, como se fosse um tabuleiro de xadrez. No sentido vertical, cada poço contém uma diferente concentração diluída da primeira substância testada de forma decrescente. Já na horizontal, uma segunda substância se adiciona a cada poço da microplaca, da esquerda para a direita de forma crescente (LORIAN, 2006). Assim, cada poço possui concentrações diferentes de cada um das duas substâncias testadas em um mesmo volume final (DOUGHERTY et al., 1977; Lorian 2006). A vantagem deste método está na possibilidade de testar várias combinações de diferentes concentrações das duas substâncias para uma mesma amostra, além de utilizar pequenos volumes de cada amostra a ser testada. A limitação do método, está em determinar apenas a atividade inibitória e não a atividade bactericida da combinação (LORIAN, 2006).

3.7.2 Citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* representam uma etapa necessária para testar o uso em humano de novos materiais e fornecem informações a respeito da toxicidade potencial de moléculas estudadas de forma mais rápida e com menos custo que os estudos *in vivo*. Na avaliação da citotoxicidade, pode ser verificada a morte, a viabilidade, os aspectos morfológicos, a integridade da membrana celular, o crescimento e a proliferação das células (CASTANO; LECHON, 2005).

O teste do ovo de galinha (HET-CAM) é bem conhecido como um teste básico que mede os efeitos agudos induzidos por uma substância de teste nos pequenos vasos sanguíneos e

proteínas da membrana corioalantóide. Propõe-se que seja semelhante ao teste de Draize, ao mesmo tempo em que oferece a vantagem de ser mais universalmente aceito como um teste mais rápido e não animal (BAGLEY et al., 1994). Na Alemanha e na França, o HET-CAM foi oficialmente aceito como um ensaio *in vitro* válido para a predição do potencial de irritação de várias substâncias irritantes (STEILING et al., 1999). Este teste tem várias vantagens, incluindo simplicidade, rapidez, sensibilidade, facilidade de desempenho e baixo custo (Vargas et al., 2007). Segundo Steiling et al. (1999) se uma substância não desenvolver sinais de hemorragia, vasoconstrição e coagulação pode-se inferir a biocompatibilidade da mesma.

O teste de hemólise utiliza células sanguíneas, os eritrócitos, como modelo para avaliar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias, possibilitando relacionar os efeitos destas sobre a membrana celular. Após a exposição ao produto teste, a ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como a primeira etapa na triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAR et al., 2007).

O bioensaio com *Artemia salina* pode ser aplicado tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de diversas substâncias químicas, inclusive para os extratos de plantas. Esse ensaio foi desenvolvido por Meyer e colaboradores em 1992 e tem como vantagens a rapidez da execução, ser de baixo custo e simples por não exigir técnicas assépticas, não sendo necessário equipamento especial ou treinamento e requer uma quantidade relativamente pequena de amostra para teste. Além disso, apresenta uma boa relação com testes *in vivo* (MEYER et al., 1992).

3.8 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG- DIC)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica utilizada para separar e analisar misturas de substâncias voláteis, onde a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado fase móvel ou gás de arraste. A amostra vaporizada é carregada pelo gás de arraste para a coluna cromatográfica contendo a fase estacionária, onde ocorre a separação da mistura (AQUINO NETO, 2003). Após a separação, as substâncias saem da coluna e passam por um detector. Este dispositivo gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído, sendo o sinal registrado em função do tempo, gerando o cromatograma. As substâncias são representadas no cromatograma como picos com área proporcional à sua massa,

possibilitando a análise quantitativa (COLLINS, 2006). Um detector de ionização de chama (DIC) consiste em uma chama de hidrogênio (H_2), ar e um prato coletor. O efluente passa da coluna do CG através da chama, que promove a divisão em moléculas orgânicas e gera íons. Um eletrodo negativo recolhe os íons, produzindo um sinal elétrico. Na análise dos óleos essenciais o DIC é o mais utilizado devido responder a todos os compostos orgânicos com alta sensibilidade, apresentando-se muito estável, e sensível a mudanças de vazão, pressão e temperatura, sendo extremamente sensível com uma faixa dinâmica grande (AULTON, 2005).

3.9 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

A separação, identificação e quantificação de constituintes em extratos complexos de plantas sempre foram, e continuará sendo uma tarefa desafiadora. O método analítico adequado para a determinação dos produtos naturais em plantas medicinais tem que cumprir as altas exigências em relação à eficiência, seletividade e sensibilidade da separação. Não apenas a matriz é altamente complexa, mas também os compostos que estão presentes apenas em quantidade reduzida ou substâncias com estrutura semelhante (GANZERA e STURM, 2018).

As estratégias para o desenvolvimento do método analítico devem ser escolhidas de acordo com o tipo de técnica a ser utilizada e depende principalmente da complexidade da amostra e da disponibilidade de materiais e do objetivo da separação (PARR; SCHMIDT, 2017)

O controle de qualidade, por meio da padronização dos extratos vegetais, é o ponto primordial para a produção de fitoterápicos com qualidade assegurada. Assim, desenvolver e validar um método analítico para a quantificação e identificação de marcadores químicos torna-se uma etapa bastante necessária na cadeia produtiva do medicamento fitoterápico. A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (VALENTINI, et al., 2007).

O processo de validação de metodologias analíticas é uma ferramenta usada para garantir a confiabilidade dos resultados, utilizando estudos experimentais, que mostrem que o método desenvolvido atende às exigências, assegurando a eficiência do método. Dessa forma, validar uma metodologia significa garantir os resultados esperados, obedecendo aos limites de

tolerância, rigorosamente preestabelecidos pela legislação vigente do país (GRANATO; NUNES, 2016; BRASIL, 2003; VALENTINI, et al., 2007).

A validação de metodologias analíticas para matérias-primas vegetais ou medicamentos fitoterápicos é realizada com base na concentração de uma substância, ou grupo de substâncias marcadoras presentes no analito (VALENTINI et al., 2007).

Métodos analíticos que não estão descritos em compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA requerem uma validação analítica. A RE 899, de 2003, traz os parâmetros que devem ser atendidos para a validação de métodos analíticos, são eles: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

Esse estudo segue o preconizado pela RE 899/2003, pois antecede o lançamento da RDC 166 em julho de 2017, pela ANVISA, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e revoga a RE 899/2003 (BRASIL, 2017; BRASIL, 2003).

3.9.1 Seletividade

De acordo com a RE 899/2003, a seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Este é um parâmetro que avalia o grau de interferência de outras substâncias com o analito, garantindo que o pico corresponde exclusivamente ao analito em questão. Uma das formas mais utilizadas de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta do analito com a matriz contendo o mesmo (RIBANI, 2004).

3.9.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Este parâmetro pode ser demonstrado através do coeficiente de correlação do gráfico obtido na curva analítica ou de calibração. A curva de calibração deve definir uma reta a partir

da leitura de pelo menos cinco pontos de concentração crescente do padrão. Essas leituras servem para avaliar o sinal medido (área do pico) e a concentração conhecida da substância em análise. A partir desses pontos experimentais é possível determinar o coeficiente de correlação (r). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$, segundo a RE 899/2003 (BRASIL, 2003). Quanto mais próximo de um, significa que menor é a dispersão do conjunto de dados experimentais e melhor é a curva. A equação da reta é calculada através do método dos mínimos quadrados e, a partir dela, é possível determinar as concentrações de analitos através do conhecimento da área do pico (BRITO, 2003; RIBANI, 2004).

3.9.3 Limite de detecção (LD) e limite quantificação (LQ)

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção (LD) pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) na relação de 10 vezes, podendo ser calculado conforme equações a seguir:

$$LD = \frac{DPax3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPax10}{IC}$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

3.9.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL,2003).

Este parâmetro de validação sempre é considerado dentro de certos limites, normalmente relacionado à precisão, aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, em três concentrações diferentes, dentro do intervalo linear, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito (RIBANI, 2004; BRASIL, 2003). A exatidão corresponde ao erro inerente ao processo, que pode ter sido por: recuperação baixa do processo de extração, imprecisão nas medidas volumétricas e a presença de interferentes (BRITO, 2003).

A recuperação é calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

3.9.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla originada de uma mesma amostra. Este ensaio se divide em repetibilidade (precisão intra-corrida), que consiste na concordância entre os resultados em um mesmo dia por um mesmo analista e em precisão intermediária (precisão inter-corridas), que se refere a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

3.9.6 Robustez

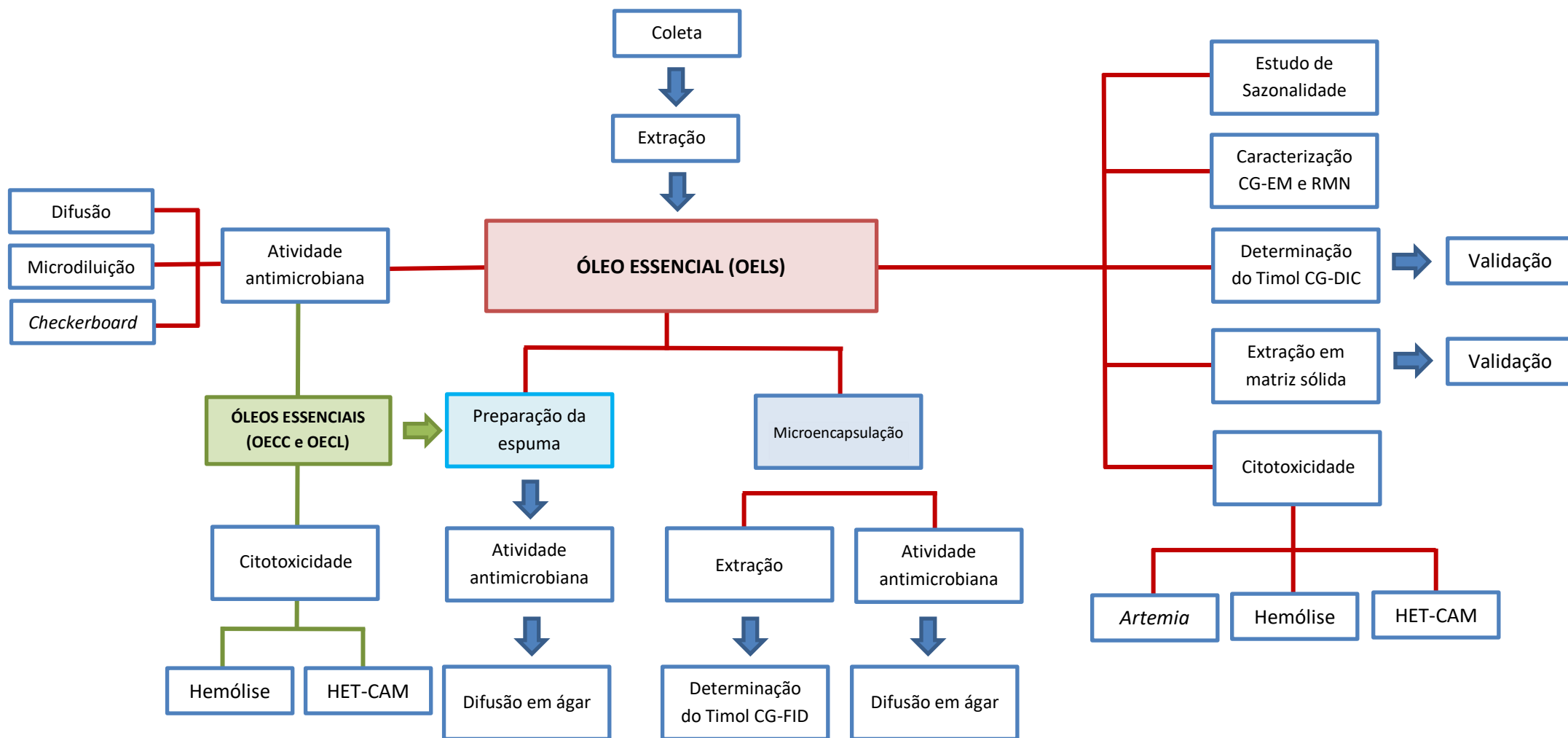
A robustez do método analítico é a medida da capacidade que o método possui em resistir às pequenas e intencionais modificações em seus parâmetros. Em cromatografia gasosa pode-se utilizar diferentes lotes ou fabricantes de colunas, variar a temperatura ou a velocidade do gás de arraste (BRASIL,2003).

Pode-se também se avaliar a estabilidade que é definida como sendo a capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações de temperatura e presença de luz no processo de armazenamento.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de novas formulações, principalmente obtidas de produtos naturais, para o tratamento de lesões ulcerativas da cavidade bucal e diante das atividades terapêuticas das plantas desse estudo, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de metodologias analíticas e processos tecnológicos para obtenção de uma espuma dental contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e os óleos de *Cymbopogon citratus* e *Citrus limon* em associação, sendo avaliada sua segurança e eficácia. A incorporação de óleos essenciais em uma forma farmacêutica espuma é inovadora para o manejo terapêutico das lesões bucais. A espécie *L. sidoides* Cham. está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil.

A Figura 11 apresenta o roteiro metodológico do estudo, demonstrando a sequência de experimentos realizados.

Figura 11 - Roteiro metodológico do estudo.



CAPÍTULO II

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TIMOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA – CG-DIC

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Obtenção do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (OELS)

As folhas, flores e galhos maleáveis (partes aéreas) da *L. sidoides* Cham. foram coletadas, partindo da extremidade da planta, por poda de galho, medindo aproximadamente 15 cm, de seis arbustos adultos no Horto de Plantas Medicinais da UFPB, no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) localizado no município de João Pessoa, Paraíba, no nordeste do Brasil (43 metros de altitude, Latitude: 7° 6' 55" Sul, Longitude: 34° 51' 40" Oeste), no período de 2014 à 2018. O cultivo foi controlado, com adubação orgânica, oferta de água e poda regular, não havendo estresse hídrico ou nutricional. A coleta foi feita por amostragem nos seis arbustos, realizada em todas as partes da planta, incluindo o ápice, base e região intermediária. A identificação botânica da *L. sidoides* Cham. foi realizada pela Profa. Dra. Rita B. Lima, e a exsicata foi incorporada sob o número JPB 47237, ao acervo do Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) na UFPB. Durante o ano de 2016, a coleta foi realizada todos os meses, às 8h, seguindo o mesmo procedimento para avaliação da sazonalidade.

A extração do OELS foi realizada no Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB, utilizando a técnica de arraste à vapor de água, sendo usado o equipamento Mini destilador de óleos essenciais (Modelo D2 – v5.2 – Linax). O óleo essencial foi extraído a partir da planta fresca, purificado por decantação e armazenado em vidro âmbar hermeticamente fechado sob refrigeração até o momento da análise. O rendimento de óleo foi calculado e expresso em porcentagem.

4.1.2 Caracterização do OELS

A densidade do óleo essencial foi determinada, utilizando um picnômetro de 5,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionou a amostra à 25°C, pesando-a em seguida e calculando a diferença de peso do picnômetro vazio e do picnômetro contendo a amostra. A partir do valor de massa obtido, a densidade foi calculada, usando a fórmula:

$$d = m/V$$

onde d é a densidade, m é a massa (g) e V é o volume (mL).

O pH do óleo foi verificado por potenciometria em quatro repetições.

4.1.3 Materiais

Os padrões timol (pureza $\geq 99,0\%$) e carvacrol (pureza $\geq 98,0\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich[®], o n-hexano 95% grau HPLC da TEDIA[®] e o hexano 95% da J. Barker[®].

4.1.4 Desenvolvimento do método cromatográfico

Foi desenvolvida uma metodologia que possibilitasse a determinação e quantificação do timol no óleo essencial de *L. sidoides* Cham., utilizando cromatografia gasosa acoplada à um detector de ionização de chamas (CG-DIC). O timol é o componente majoritário presente neste óleo e sua determinação e quantificação é importante para identificação e controle de qualidade do óleo em questão.

Para a quantificação do timol no óleo essencial de *L. sidoides* Cham., foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo CG 17-A, com sistema equipado com um injetor automático e Detector de Ionização de Chama (DIC). A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class 5000.

4.1.5 Preparação das soluções padrão de timol, carvacrol e óleo essencial

A solução estoque do padrão timol foi preparada, dissolvendo 200 mg de timol em 10 mL de n-hexano, para obtenção de uma solução na concentração de 19,3 mg.mL⁻¹ (densidade do timol 0,965 g.mL⁻¹). A partir dessa solução, foi retirado 200 µL e transferidos para um balão

volumétrico de 10 mL, sendo completado com n-hexano para obtenção da concentração de análise ($0,3860 \text{ mg.mL}^{-1}$).

A solução estoque do padrão carvacrol foi preparada, dissolvendo 200 μL de carvacrol em 10 mL de n-hexano, para obtenção de uma solução na concentração de $19,52 \text{ mg.mL}^{-1}$ (densidade do carvacrol $0,976 \text{ g.mL}^{-1}$). A partir dessa solução, foi retirado 200 μL e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sendo completado com n-hexano para obtenção da concentração de análise ($0,3904 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Para o óleo essencial, foi preparada uma solução estoque através da diluição de 200 μL do óleo em 10 mL de n-hexano, sendo obtida uma solução na concentração de $18,86 \text{ mg.mL}^{-1}$ (densidade do OEELS $0,9432 \text{ g.mL}^{-1}$). A partir da solução estoque, foi retirado 200 μL , transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sendo completado com n-hexano para obtenção da concentração de análise ($0,377 \text{ mg.mL}^{-1}$).

4.1.6 Validação de metodologia analítica por CG-DIC

O método analítico para quantificação de timol presente no OEELS por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) foi validado, segundo o que preconiza a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção e robustez (BRASIL, 2003).

4.1.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da análise dos perfis cromatográficos da solução padrão de timol, do n-hexano (branco), da solução contendo o óleo essencial e da solução contendo carvacrol. Para que o método seja seletivo a resposta analítica deve ser exatamente referente ao analito sem interferências, sendo usado carvacrol que é estruturalmente semelhante ao timol, comparando os picos obtidos com o pico de comprovação da presença do timol a partir da substância padrão.

4.1.6.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir da construção de três curvas de calibração com o padrão timol, a qual contemplou sete concentrações distintas: 0,0965, 0,1930, 0,2895, 0,3860, 0,4825, 0,5790 e 0,6755 mg.mL⁻¹. A partir das três curvas, foi obtida a linearidade média com a finalidade de avaliar a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. Os valores foram analisados através da regressão linear e do coeficiente de correlação.

4.1.6.3 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente a partir dos dados da curva de calibração obtida na linearidade média. O limite de detecção (LD) foi determinado a uma relação sinal-ruído (S/N) de 3,0 e o limite de quantificação (LQ) foi determinado a razão de S/N de 10, sendo calculado conforme equações a seguir:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde: *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e *IC* é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

4.1.6.4 Precisão

O ensaio da precisão, realizado para avaliar a proximidade dos resultados em várias análises, foi avaliado em três níveis de concentração da solução de óleo essencial: baixa, média e alta com teor de 50% (0,1415 mg.mL⁻¹), 100% (0,2830 mg.mL⁻¹) e 150% (0,4244 mg.mL⁻¹) respectivamente. Foram feitas seis determinações, correspondendo à repetibilidade (intra-dia)

e repetida esta análise em um segundo dia, para determinar a precisão intermediária (inter-dia). A precisão foi verificada pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%), sendo considerado preciso quando apresentou DPR menor ou igual a 5%, de acordo com a legislação vigente.

4.1.6.5 Exatidão

A exatidão do método foi estabelecida, utilizando três níveis de concentração da solução de óleo essencial: baixa, média e alta com teor de 50%, 100% e 150% respectivamente em relação à concentração teórica de 0,2830 mg.mL⁻¹, sendo realizadas seis determinações em cada nível de concentração. A exatidão foi obtida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo expressa em percentagem de acordo com a equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

4.1.6.6 Robustez

A robustez foi analisada a partir de modificações intencionais nas condições do método analítico desenvolvido, com alterações na temperatura do injetor ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) e mudança da marca do hexano utilizado, além da verificação da estabilidade.

Para o estudo de estabilidade, foram retiradas amostras da solução de óleo essencial na concentração média (100%) e armazenadas em diferentes condições de temperatura por 24 h. Durante este período, as amostras foram mantidas sob refrigeração (6°C), na ausência de luz a temperatura de 16°C e na presença de luz à 16°C . Foram realizadas leituras para determinação do timol no tempo 0 e 24 h e calculado o desvio padrão relativo.

As amostras foram consideradas estáveis e o método robusto se o desvio do valor nominal estivesse dentro de 5,0%.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Caracterização do OELS

A densidade do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. foi determinada a partir do valor de massa obtido e a densidade foi calculada, resultando em um valor de $0,9432 \text{ g.mL}^{-1}$. Alguns estudos trazem valores semelhantes como o de Fernandes et al. (2008) e Reis (2010) que relataram a densidade do OELS como sendo $0,934 \text{ g mL}^{-1}$.

O pH do óleo foi verificado por potenciometria em quatro repetições, tendo uma média de 5,27.

4.2.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

O método cromatográfico para quantificação do timol no óleo essencial de *L. sidoides* Cham. foi baseado inicialmente em método validado para quantificação de substâncias voláteis derivadas de óleos essenciais desenvolvido por Trajano (2012) que aplicou na quantificação do eugenol no óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, sendo considerados como parâmetros de referência. O solvente utilizado foi o n-hexano por ser o solvente com características físico-químicas adequadas para os estudos com cromatografia gasosa e por ter apresentado boa amplitude dos picos na avaliação dos padrões. As amostras do óleo essencial e do marcador padrão foram solubilizadas por diluição simples no solvente extrator.

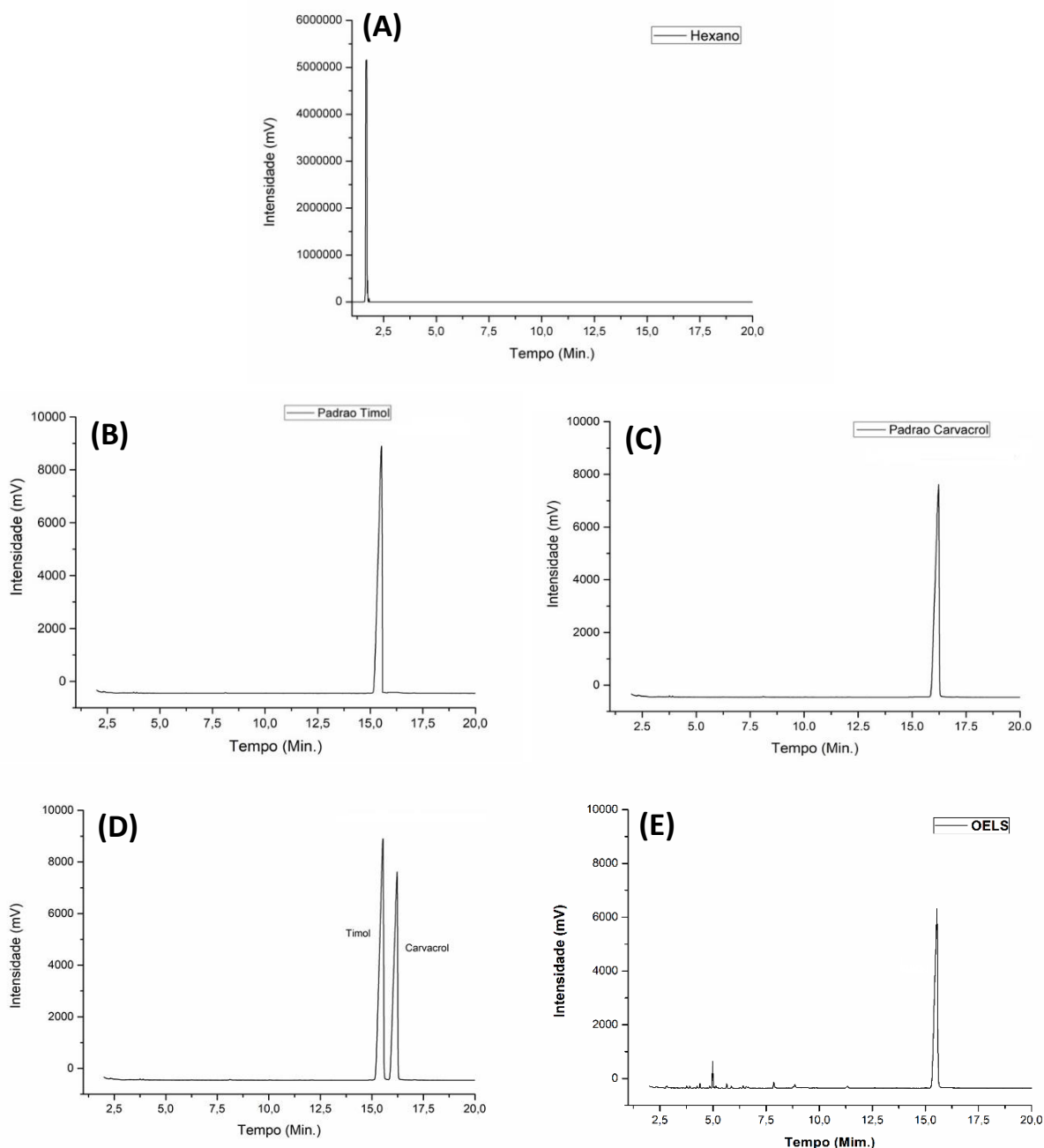
A partir dos parâmetros iniciais, foram realizados ajustes na temperatura do forno, no split e na rampa de aquecimento, ajustando a melhor condição de separação, avaliando os parâmetros de resolução do pico do marcador, assim como o tempo de corrida analítica, definindo uma melhor seletividade.

Assim, o método desenvolvido foi estabelecido com os parâmetros da fase móvel composta de nitrogênio e bombeada na vazão de $1,6 \text{ mL/min.}$ com split 1:5 e volume de injeção foi de $1,0 \text{ }\mu\text{L}$, utilizando uma coluna capilar DB-1 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$; $0,25 \text{ }\mu\text{m}$), com um programa de temperatura da coluna de 60°C a 90°C a 5°C/min. , permanecendo a 90°C por 15 minutos e de 90°C a 280°C a 20°C/min. com temperaturas fixas de 260 e 280°C do injetor e do detector, respectivamente.

4.2.3 Seletividade

O método cromatográfico proposto mostrou-se seletivo, uma vez que foi possível quantificar o timol presente no OELS, apresentando um pico sem interferência de outras substâncias, sendo obtido o tempo de retenção por volta de 15 minutos. Mesmo quando associado ao padrão carvacrol que apresenta estrutura química semelhante ao timol, foi possível identificar o pico referente ao timol. O pico do carvacrol apresenta tempo de retenção por volta de 16 minutos. Analisando os cromatogramas da Figura 12 podemos observar que não houve presença de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao timol.

Figura 12 - Cromatograma referente à seletividade do método de quantificação do timol no OELS pelo CG-DIC. (A) Hexano; (B) Solução padrão de timol; (C) Solução padrão de carvacrol; (D) Solução padrão de timol/carcacrol; (E) Solução de óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (OELS).



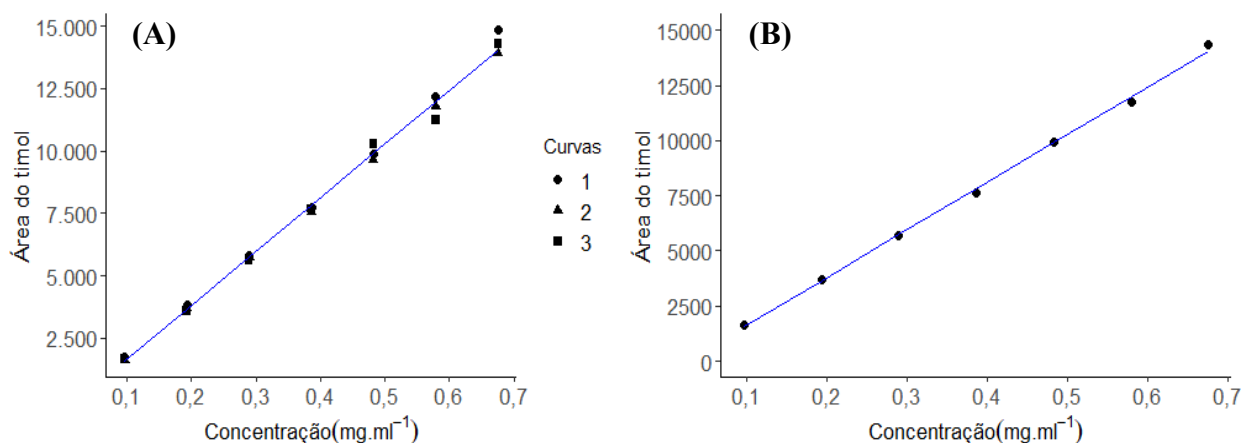
4.2.4 Linearidade

A curva de calibração do método foi obtida através de análises de soluções do padrão de timol em concentrações diferentes (25%, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % e 175% da concentração teórica de 0,3860 mg.mL⁻¹. As análises foram feitas em triplicata para cada um dos sete níveis e os resultados são apresentados na tabela 1 e as curvas de calibração e de linearidade média expressa na Figura 13.

Tabela 1 - Resultados obtidos para linearidade do timol.

Padrão (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Área timol Curva 1	Área timol Curva 2	Área timol Curva 3	DPR%
25	0,0965	1713	1589	1676	3,84
50	0,1930	3818	3680	3598	3,01
75	0,2895	5809	5750	5606	1,83
100	0,3860	7705	7572	7682	1,00
125	0,4825	9845	9647	10277	3,25
150	0,5790	12144	11799	11250	3,84
175	0,6755	14835	13894	14270	3.30

Figura 13 – (A) Curvas de calibração (C1, C2 e C3) e (B) linearidade média, obtidas para avaliação da linearidade do método para quantificação do timol no OELS, utilizando CG-DIC.



Foram estimados os parâmetros do modelo ajustado considerando os valores médios das três curvas de linearidade. As estimativas dos parâmetros, erros padrão e p-valores associados

aos parâmetros do modelo são apresentados na Tabela 2. O teste F de adequação global indica que há uma estrutura de regressão subjacente as variáveis concentração e área do timol ao nível de significância de 5% ($p\text{-valor} = 2,6 \times 10^{-8}$). O teste t para o parâmetro da variável concentração também sinaliza que essa variável é importante para prever a área do timol considerando os níveis usuais de significância ($p\text{-valor} < 0,05$). O R^2 associado ao modelo ajustado foi de 0,9986, o que implica que a concentração explica 99,86% da variabilidade presente na área do timol.

Tabela 2 - Estimativas, erros padrão e p-valores para os parâmetros do modelo com os dados de linearidade média.

Coeficiente	Estimativa	erro padrão	p-valor
Intercepto	-509,6	157,2	0,0229
Concentração	21.571,8	364,2	0,0000

4.2.5 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os valores dos limites de detecção e quantificação foram estimados com base nos resultados do ajuste da reta de mínimos quadrados aos dados de linearidade média. Considerando o erro padrão do intercepto e a estimativa do coeficiente da variável independente concentração (Tabela 2), os valores foram 0,022 mg.mL^{-1} para o limite inferior de detecção e 0,073 mg.mL^{-1} para o limite de quantificação, apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Dados dos parâmetros de linearidade para o timol.

Padrão	Coeficiente de regressão linear (R^2)	Equação da curva de calibração $y = ax + b$	Limite de Detecção (mg.mL^{-1})	Limite de Quantificação (mg.mL^{-1})
Timol	0.9986	$y = 21571,8x - 509,6$	0,022	0,073

A equação da regressão linear ($y = 21571,8x - 509,6$) e o coeficiente de correlação (R^2) de 0,9986, demonstraram que as áreas obtidas são diretamente proporcionais às concentrações

do timol, sendo o método considerado linear, estando o resultado obtido dentro do critério de aceitação $R^2 \geq 0,99$ (BRASIL, 2003).

4.2.6 Precisão

A precisão intra-dia (repetibilidade) avaliou a concordância dos resultados em um curto período por um mesmo analista, enquanto a precisão intermediária (inter-dia) avaliou a proximidade dos resultados obtidos em dias diferentes. A precisão trata-se de um parâmetro que é avaliado através da determinação do desvio padrão relativo (DPR) das análises, de acordo com a RE nº 899, de 2003, da ANVISA.

Para a precisão intra-dia (repetibilidade) foram realizadas análises em três níveis de concentração de solução de óleo essencial: baixa, média e alta com teor de 50%, 100 % e 150%, respectivamente, em relação à concentração teórica de 0,2830 mg.mL⁻¹. Foram feitas 6 determinações em cada nível de concentração, levando em consideração o desvio padrão relativo máximo de 5% apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade.

Nível de Concentração	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	0,1286 $\pm$ 0,0054	4,20
Média	0,2661 $\pm$ 0,0045	1,70
Alta	0,4288 $\pm$ 0,0068	1,58

* Média de seis determinações.

Para precisão intermediária foram realizadas análises em três níveis de concentração de solução de óleo essencial: baixa, média e alta com teor de 50%, 100 % e 150%, respectivamente, em relação à concentração teórica de 0,2830 mg.mL⁻¹. Foram feitas 6 determinações em cada nível de concentração (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária.

Nível de Concentração	Análise	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	1ª precisão	0,1332 $\pm$ 0,0024	1,79
	2ª precisão	0,1253 $\pm$ 0,0021	1,69
	Média	0,1292 $\pm$ 0,0047	3,61
Média	1ª precisão	0,2686 $\pm$ 0,0105	3,91
	2ª precisão	0,2679 $\pm$ 0,0031	1,16
	Média	0,2682 $\pm$ 0,0074	2,76
Alta	1ª precisão	0,4379 $\pm$ 0,0126	2,87
	2ª precisão	0,4510 $\pm$ 0,0159	3,52
	Média	0,4336 $\pm$ 0,0117	2,70

* Média de seis determinações.

A precisão intra-dia apresentou valores de DPR entre 1,58-4,20%, mostrando que houve concordância entre os resultados no período de análise de um dia, com o mesmo analista e mesmo equipamento, enquanto a precisão intermediária apresentou DPR entre 2,70-3,61%. Assim o método foi considerado preciso, uma vez que os valores de DPR encontram-se dentro do limite especificado, ou seja, inferior a 5%.

4.2.7 Exatidão

Para análise da exatidão dos resultados foram avaliados três níveis de concentração para recuperação, baixa (50%), média (100%) e alta (150%), com 6 determinações em cada nível conforme apresentado na Tabela 6.

Os resultados mostram que o método se apresenta adequado em relação à exatidão, pois os valores médios de recuperação estão de acordo com os valores admitidos para a recuperação (95,0 a 105,0%).

Tabela 6 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método.

Nível de Concentração	Concentração Teórica (mg.mL ⁻¹)	Concentração Média Determinada*	Erro absoluto	Erro relativo	Recuperação (%)
Baixa	0,1415	0,1352	0,044	4,44	95,55
Média	0,2830	0,2736	0,033	3,31	96,68
Alta	0,4244	0,4379	0,032	3,17	103,17

* Média de seis determinações.

4.2.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir de modificações deliberadas nas condições e parâmetros de análise do método proposto, sendo verificadas a variação de temperatura do injetor (250°C e 270°C), a variação da marca de solvente utilizado (hexano) e estabilidade das amostras de óleo essencial para variação de temperatura de armazenamento (0 e 24 h) (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado obtido para robustez com amostras de padrão timol e óleo essencial para variação de temperatura do injetor (250°C e 270°C) e variação da marca de solvente utilizado (hexano).

Amostras	Condições	Conc. Teórica (mg.mL ⁻¹)	CMD*	Recuperação (%)	Média ± DP	CV (%)
	Temperatura/ Marca do Hexano					
Método proposto Timol	260°C HexanoTedia®	0,3860	0,3860	100,00	0,3860 ± 0,011	2,83
	250°C	0,3860	0,3671	95,10	0,3766 ± 0,014	3,71
	270°C	0,3860	0,3750	95,81	0,3805 ± 0,011	2,99
	Hexano J. Barker®	0,3860	0,3705	95,99	0,3783 ± 0,011	2,95
Método proposto OELS	260°C HexanoTedia®	0,2830	0,2831	100,03	0,2831 ± 0,004	1,27
	250°C	0,2830	0,2835	100,21	0,2838 ± 0,004	1,56
	270°C	0,2830	0,2808	99,22	0,2824 ± 0,004	1,43
	Hexano J. Barker®	0,2830	0,2766	97,75	0,2824 ± 0,004	1,81

* Concentração média determinada (CMD) em três determinações.

De acordo com resultados, as alterações nas condições analíticas do método, tanto em relação à temperatura do injetor quanto à mudança na marca do solvente apresentaram coeficientes de variação menores que 5%, podendo ser considerado que o método proposto é robusto em relação às variáveis analisadas.

O estudo de estabilidade foi realizado com amostras da solução de óleo essencial na concentração média $0,2830 \text{ mg.mL}^{-1}$ (100%) que foram armazenadas sob refrigeração (6°C), na ausência de luz a temperatura de 16°C e na presença de luz à 16°C por 24 h. Os resultados obtidos com as leituras para determinação do timol após 24 h evidenciaram que as amostras não se mantiveram estáveis após esse período, devendo ser realizada a análise logo após a preparação da amostra e que devem ser mantidas em recipientes hermeticamente fechados para evitar a volatilização devido à pressão dos vapores e protegidas da luz. Tal fato não é surpreendente devido as características intrínsecas do analito e da amostra e das variações nas concentrações nos processos de preparações de amostras em diferentes etapas do método de análises.

4.3 Conclusão

A coleta de *L. sidoides* Cham. no Horto de Plantas Medicinais da UFPB e a extração de seu óleo essencial no Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho, ambos no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) foram satisfatórias para obtenção do óleo essencial para as análises realizadas.

O timol é o componente majoritário presente neste óleo e sua determinação e quantificação é importante para identificação e controle de qualidade do óleo em questão. De acordo com os resultados obtidos, foi possível desenvolver um método analítico para quantificação de timol presente no óleo essencial de *L. sidoides* Cham., o qual foi validado conforme as normas preconizadas pela ANVISA através da Resolução nº 899, de 2003, atendendo aos requisitos necessários para um método analítico, confirmando a cromatografia gasosa acoplada à detector de ionização de chamas (CG-DIC) como instrumento analítico sensível e economicamente viável para quantificar o teor de timol no óleo essencial.

CAPÍTULO III

5. SAZONALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. (OELS)

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Determinação da umidade

Para avaliação da umidade, foram coletadas amostras das partes aéreas da *L. sidoides* Cham., sendo pesadas 4 amostras (± 20 g) e seu peso de massa fresca exatamente registrado. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa à 65°C com circulação de ar por 24h para posterior pesagem e registro da massa seca. Após a pesagem, as amostras foram colocadas novamente em estufa por 1 h para verificar se houve alteração no peso. A porcentagem de umidade (%U) foi então calculada de acordo com a fórmula:

$$\%U = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} \times 100$$

5.1.2 Variáveis climáticas

Os dados de temperatura, umidade e insolação dos dias em que ocorreram as coletas da planta foram obtidos através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP), consultados através do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Todos os resultados gráficos e numéricos foram obtidos com auxílio do software estatístico *R*, em sua versão 3.3.1 para sistema operacional Windows. O *R* é um software livre e possui uma ampla variedade de bibliotecas que permitem realizar diversos tipos de análises estatísticas (<https://cran.r-project.org/>).

5.1.3 Rendimento do óleo essencial

Seguindo o que preconiza a FARMACOPEIA BRASILEIRA IV (1996), o rendimento, expresso em porcentagem, foi calculado a partir da relação massa/massa pela medida da

densidade, observando o volume obtido do OELS por massa seca (g) da planta em estudo, conforme fórmula abaixo

$$\% R = (V.d/m) \times 100$$

Onde:

V = volume de óleo extraído (mL)

d = densidade do óleo (g.mL⁻¹)

m = massa seca (g)

5.1.4 Avaliação da composição química do OELS

5.1.4.1 Materiais

Foram usados o n-hexano 95% HPLC (TEDIA[®]), o hexano (J. Barker[®]) e o timol (pureza $\geq 99,0\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich.

5.1.4.2 Preparação das soluções padrão de timol e óleo essencial

A solução estoque do padrão timol foi preparada, dissolvendo 200 mg de timol em 10 mL de n-hexano, em um balão volumétrico de 10 mL, para obtenção de uma solução na concentração de 19,3 mg.mL⁻¹ (densidade do timol 0,965 g.mL⁻¹). A partir dessa solução, foi retirado 500 µL e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sendo completado com n-hexano para obtenção da concentração de análise (0,965 g.mL⁻¹).

Para o óleo essencial, foi preparada uma solução estoque através da diluição de 200 µL do óleo essencial em 10 mL de n-hexano, sendo obtida uma solução na concentração de 18,86 mg.mL⁻¹ (densidade do OELS 0,9432 g.mL⁻¹). A partir da solução estoque, foi retirado 500 µL, transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sendo completado com n-hexano para obtenção da concentração de análise (0,9432 mg.mL⁻¹).

5.1.4.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)

A caracterização dos constituintes químicos do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à um detector de massa (CG-EM), com a finalidade de determinar o percentual de cada um dos constituintes encontrados. Esse teste foi realizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LCMA) no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo utilizado um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010 Ultra com coluna da marca RTX-5MS capilar (5% Difenil / 95% dimetilpolisiloxano) com tamanho de 30m (comprimento) / 0.25 mm de diâmetro Interno / 0.25 μm .

Para análise do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. foram seguidas as condições cromatográficas usadas na metodologia de determinação e quantificação de timol no óleo essencial por CG-DIC, já validada. A fase móvel foi composta de hélio e bombeada na vazão de 1,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a temperatura do forno da coluna foi programada para passar de uma temperatura inicial de 60°C a 90°C a 5°C/min., permanecendo a 90°C por 15 minutos e de 90°C a 280°C a 20°C/min. A temperatura do injetor e do detector foram 260 e 280°C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 30 minutos e o volume de injeção foi de 1,0 μL .

A porcentagem relativa de componentes individuais foi obtida a partir das áreas dos picos e os componentes dos óleos essenciais foram identificados pela comparação de seus índices de retenção e espectros de massa com os dados encontrados na literatura e biblioteca do equipamento (Bancos de Dados: NIST2008 | NIST2008+Shimadzu | FFNSC 1.3).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Determinação da umidade

As amostras das partes aéreas de *L. sidoides* Cham. foram pesadas antes e após o processo de secagem, sendo então calculada a porcentagem de umidade. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 8, sendo a porcentagem de umidade encontrada de $69,48 \pm 0,8771$.

Este resultado se assemelha ao encontrado por Melo et al., (2011) que avaliando o rendimento e umidade em diferentes horários de colheita (6:00, 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00h) das folhas de *L. sidoides* obteve o teor de umidade médio de 71,37%.

Tabela 8 - Porcentagem de umidade calculada a partir das amostras das partes aéreas de *L. sidoides* Cham.

Amostra	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Umidade (%)
1	20,4361	6,1001	70,15
2	20,6650	6,1360	70,31
3	20,7780	6,4671	68,88
4	20,5106	6,4453	68,58
Média ± Desvio padrão	20,5974 ± 0,1536	6,2871 ± 0,1960	69,48 ± 0,8771

5.2.2 Variáveis climáticas

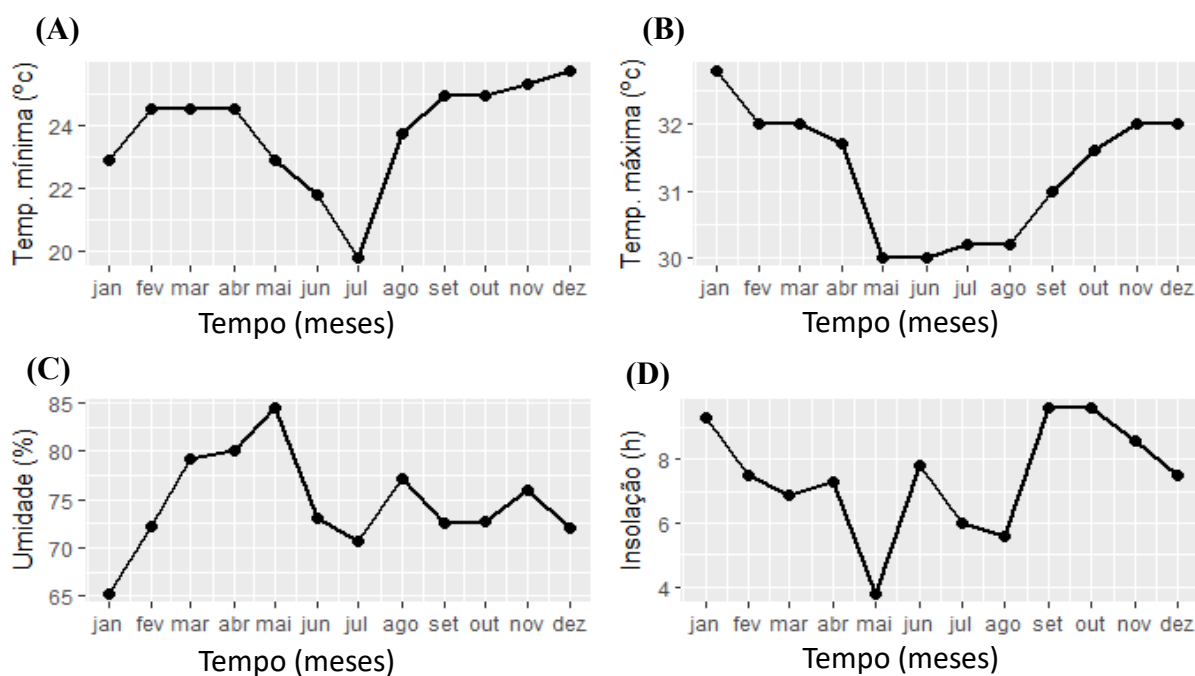
Durante o período de janeiro a dezembro de 2016 foram registradas as variáveis climáticas temperatura mínima e máxima, umidade relativa do ar e insolação. Na Tabela 9 e Figura 14 são apresentados os registros dessas variáveis e são sumarizadas algumas medidas descritivas. A média das temperaturas mínimas e máximas foi de $23,8 \pm 1,69^{\circ}\text{C}$ e $31,3 \pm 0,97^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Além disso, o coeficiente de variação foi de 7,11% para a temperatura mínima e de 3,10% para a temperatura máxima. Contudo, tais variáveis apresentaram-se bastante homogêneas durante o período de estudo. A umidade relativa média para o período considerado foi de $74,6 \pm 5,07\%$ e coeficiente de variação de 6,79%. No que se refere a insolação, a média foi de 7,5h com desvio padrão de 1,74. O coeficiente de variação (23,32%) indica que houve uma heterogeneidade considerável desta variável quando comparadas as demais variáveis climáticas.

Tabela 9 - Medidas descritivas das variáveis climáticas para o período de janeiro a dezembro de 2016.

Mês	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Umidade Relativa (%)	Insolação (h)
Janeiro	22,9	32,8	65,25	9,3
Fevereiro	24,5	32,0	72,25	7,5
Março	24,5	32,0	79,25	6,9
Abril	24,5	31,7	80,00	7,3
Maio	22,9	30,0	84,50	3,8
Junho	21,8	30,0	73,00	7,8
Julho	19,8	30,2	70,75	6,0
Agosto	23,7	30,2	77,25	5,6
Setembro	24,9	31,0	72,50	9,6
Outubro	24,9	31,6	72,75	9,6
Novembro	25,3	32,0	76,00	8,6
Dezembro	25,7	32,0	72,00	7,5
Média	23,8	31,3	74,60	7,5
Mediana	24,5	31,7	72,90	7,5
Mínimo	19,8	30,0	65,30	3,8
Máximo	25,7	32,8	84,50	9,6
Desvio padrão	1,69	0,97	5,07	1,74
CV (%)	7,11	3,10	6,79	23,32

Fonte: Dados climáticos BDMEP/INMET.

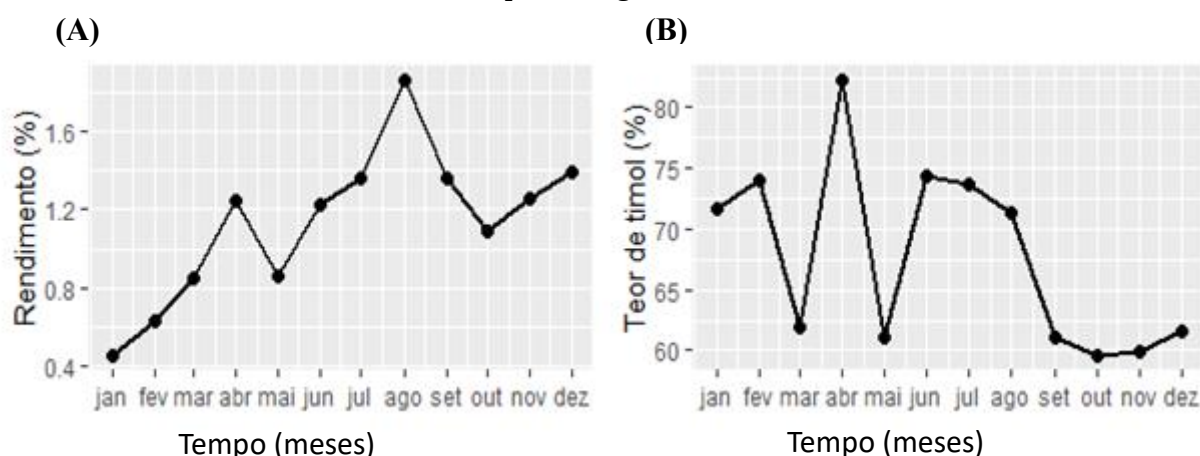
Figura 14 - Gráficos das séries: (A) temperatura mínima (°C), (B) temperatura máxima (°C), (C) umidade relativa do ar (%) e (D) insolação (h) de janeiro a dezembro de 2016.



5.2.3 Rendimento e teor de timol

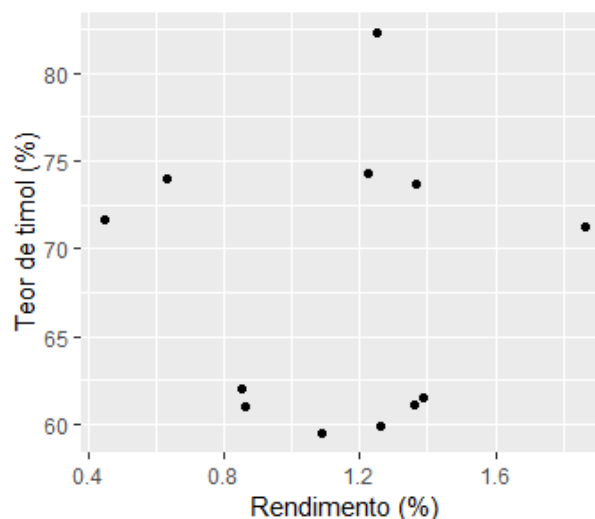
Para o rendimento são apresentados o percentual médio em relação à massa seca, durante o período analisado que foi de $1,13 \pm 0,38\%$. O coeficiente de variação associado a esta variável foi de 33,63%, indicando uma heterogeneidade não desprezível. Quanto ao teor de timol, a média foi de $67,7 \pm 7,66\%$ com coeficiente de variação de 11,31%, indicando que a concentração do óleo foi homogênea durante o período de janeiro a dezembro de 2016. Na Figura 15 são apresentadas as séries de percentual de rendimento e teor de timol ao longo do período de janeiro a dezembro de 2016. O percentual de rendimento apresentou nesse período um comportamento crescente, com um pico referente ao mês de agosto/2016. Em contrapartida, o teor de timol apresentou comportamento estacionário em torno da média de 67,7% com pequenas variações.

Figura 15 - Séries de rendimento (A) e teor de timol (B) de janeiro a dezembro de 2016, em porcentagem.



Com base no gráfico de dispersão entre percentual de massa seca e o teor de timol para os dados de rendimento (Figura 16) nenhum padrão não aleatório é identificado, sugerindo que não há relação entre as variáveis. O coeficiente de correlação de Pearson estimado entre essas variáveis foi 0,008. Além disso, o teste t-Student associado, cujo p-valor foi 0,981, confirma a hipótese de que tais variáveis não são correlacionadas significativamente (p-valor > 0,05).

Figura 16 - Gráfico de dispersão entre rendimento (%) e teor de timol (%) de janeiro a dezembro de 2016.



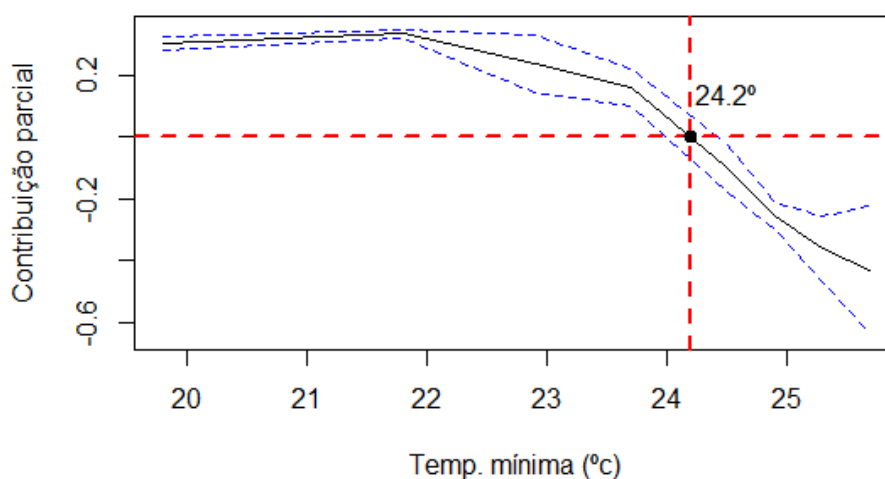
Na avaliação da relação existente entre as variáveis dependentes percentual de rendimento e teor de timol e as variáveis independentes temperatura mínima, máxima, umidade relativa do ar e insolação. Os resultados do ajuste do modelo são apresentados na Tabela 10. Foi verificado para o teor de timol que, considerando um nível de significância de 5%, apenas a variável temperatura mínima foi significativa para predizer o teor de timol. Além disso, as variáveis temperatura máxima ($p\text{-valor} = 0,0006$) e umidade relativa do ar ($p\text{-valor} = 0,001$) apresentaram impactos significativos para a dispersão da resposta teor de timol. Os sinais das estimativas dos parâmetros permitem identificar de que forma essas variáveis impactam a resposta média do teor de timol. O sinal negativo da variável temperatura mínima indica que um aumento no valor dessa variável corresponde a uma redução no teor médio de timol. Já quanto à dispersão, os sinais positivos das variáveis temperatura máxima e umidade relativa do ar indicam que um aumento no valor dessas variáveis corresponde a um incremento na variação do teor de timol.

Tabela 10. Resultados do modelo beta semiparamétrico para a variável teor de timol (%).

Média			
Variável	Estimativa	Erro padrão	p-valor
Intercepto	3,3199	0,0642	0,0000
cs (Temp. mínima, df = 3)	-0,1090	0,0031	0,0000
Dispersão			
Variável	Estimativa	Erro padrão	p-valor
Intercepto	-82,5587	6,1443	0,0002
Temp. máxima	1,7526	0,1803	0,0006
Umidade	0,3301	0,0209	0,0001

Na Figura 17 é apresentada a curva suavizada para temperatura mínima. Esse gráfico permite avaliar de forma mais precisa o impacto da variável independente sobre a variável resposta ao longo de todos os seus valores. De modo geral, é possível perceber que há uma tendência de contribuição parcial decrescente para o teor de timol médio à medida que a temperatura mínima aumenta. Contudo, para temperaturas inferiores a 24,2°C essa variável contribui positivamente para o teor de timol médio como ilustrado na Figura 17.

Figura 17 - Contribuição parcial da variável temperatura mínima (°C) para o teor médio de timol (%).



Os resultados do modelo foram validados a partir da análise de resíduos a fim de reduzir possíveis vieses nas análises. Na Figura 18 é apresentado o gráfico dos resíduos versus a ordem das observações. Os resíduos do modelo estão concentrados em torno do zero e não apresentam

nenhum padrão sistemático, indicando que o modelo se ajustou adequadamente aos dados. No que se refere a distribuição assumida para a variável resposta foi construído o gráfico quantil-quantil (Figura 19). Os resíduos encontram-se dentro dos limites de confiança de modo que não há evidências para rejeitar a hipótese de que o modelo beta se ajustou adequadamente, validando os resultados obtidos a partir desse modelo.

Figura 18 - Gráfico dos quantis residuais normalizados versus ordem das observações do modelo para o teor de timol (%).

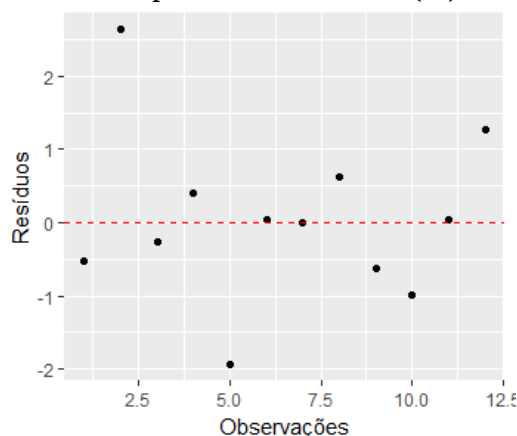
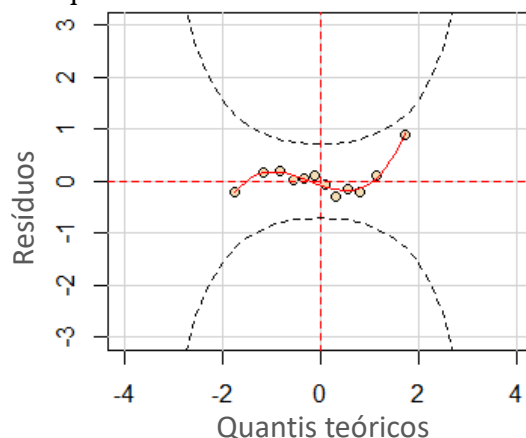


Figura 19 - Gráfico dos quantis residuais normalizados do modelo para teor de timol (%).



De maneira análoga ao modelo considerado para a variável teor de timol, assumimos agora como variável dependente o percentual de rendimento e como independentes as variáveis climáticas anteriormente descritas. Novamente foi considerado o modelo de regressão beta uma vez que os dados de percentual de rendimento são limitados. Os resultados da estimativa do modelo são apresentados na Tabela 11. É possível verificar que apenas a variável temperatura máxima foi significativa para explicar o percentual de rendimento, cujo p-valor associado foi

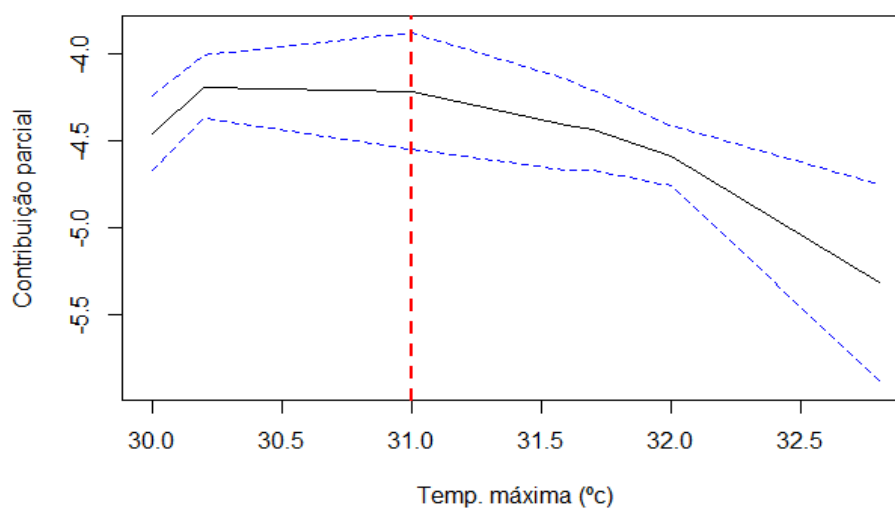
de 0,0000. O sinal negativo dessa variável implica que à medida que há um aumento na temperatura máxima há uma redução do percentual de rendimento médio. Ao contrário do que foi observado para o teor de timol, nenhuma das variáveis foram significativas para explicar a dispersão nos dados.

Como a variável temperatura máxima foi considerada de forma não paramétrica, apresentamos sua contribuição parcial para o percentual de rendimento através da sua curva suavizada, ilustrada na Figura 20. Para todo o conjunto de temperaturas máximas é possível notar que há uma contribuição parcial negativa dessa variável para o percentual de rendimento médio. Por outro lado, essa contribuição é mais acentuada para valores de temperatura máxima superior a 31°C.

Tabela 11. Resultados do modelo beta semiparamétrico para a variável percentual de rendimento.

Média			
Variável	Estimativa	Erro padrão	p-valor
Temp. máxima	-0,1434	0,0020	0,0000
Dispersão			
Variável	Estimativa	Erro padrão	p-valor
Intercepto	-3,7804	0,2093	-

Figura 20 - Contribuição parcial da variável temperatura máxima (°C) para o percentual de rendimento.



No sentido de validar os resultados encontrados através do modelo estimado foram realizadas inspeções dos resíduos do modelo. Na Figura 21 é apresentado o gráfico dos resíduos versus a ordem das observações. Como observado para o modelo para o teor de timol, aqui também não há nenhum padrão sistemático no gráfico. Além disso, os resíduos tendem a se concentrar em torno do zero o que evidencia que o modelo se ajustou adequadamente aos dados. O gráfico de quantis (Figura 22) confirma a hipótese que o modelo de regressão baseado na distribuição beta é adequado, uma vez que os resíduos se encontram dispersos dentro dos limites de confiança. Dessa forma, os resultados obtidos a partir do modelo são válidos estatisticamente, já que as suposições básicas para aplicação desse modelo foram satisfeitas.

Figura 21. Gráfico dos quantis residuais normalizados versus ordem das observações do modelo para percentual de rendimento.

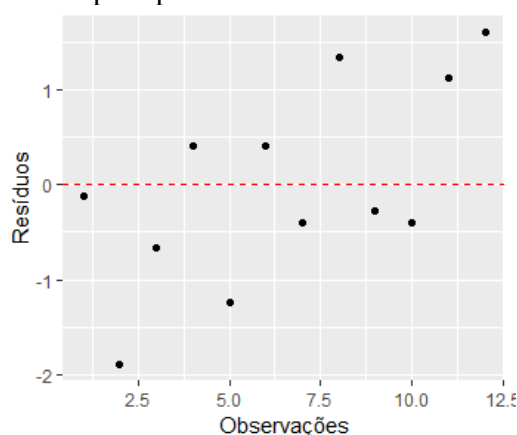
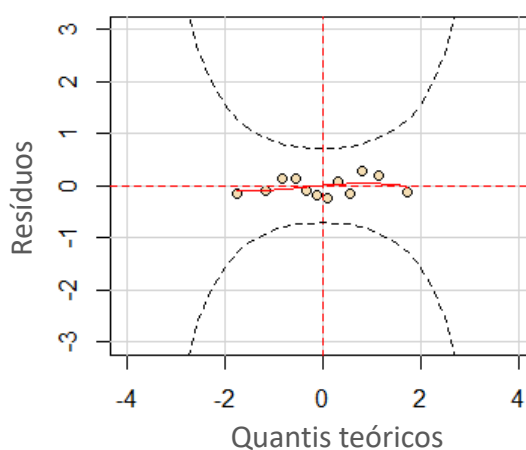


Figura 22. Gráfico dos quantis residuais normalizados do modelo para percentual de rendimento.



O rendimento dos óleos essenciais pode ser bastante variável, podendo ocorrer diferenças significativas em uma mesma espécie, dependendo da época do ano, do horário da colheita, da região ou condições de cultivo, das condições climáticas, da parte da planta utilizada, da idade da planta e pela técnica de colheita e pós-colheita, podendo estes fatores estarem correlacionados (MORAIS, 2009; BARROS et al., 2009; GOBBO-NETO e LOPES 2007).

O rendimento médio de óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. obtido no estudo foi $1,13 \pm 0,38\%$. Esse rendimento no processo de extração do óleo essencial das partes aéreas da planta sofre influência das variáveis climáticas, especialmente da temperatura máxima, onde o aumento dessa variável promove uma redução do percentual de rendimento médio. O valor de rendimento encontrado ficou abaixo do relatado na literatura que é de cerca de 4% (MATOS, 2000; LACOSTE et al., 1996; LEMOS et al., 1992).

O rendimento de óleo essencial das folhas de *L. sidoides* em diferentes horários de colheita (6:00, 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00h) foi avaliado por Melo et al., (2011). Em seu estudo, no horário das 9h foi encontrado o maior valor de rendimento (5,64%). Já o menor valor encontrado foi 3,08%, correspondente ao horário de colheita de 6h da manhã, que, segundo Silva et al., (2003), pode estar relacionado à presença de orvalho nas folhas, o qual aumentaria a umidade fazendo com que haja uma diminuição da quantidade de material a ser extraído.

No estudo de Moraes et al., (2009 b) foi avaliada a composição química e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) submetido a dois tipos de extração, sendo verificado que o percentual de óleo essencial obtido foi de 4,2% para o método de hidrodestilação e de 1,96% para o método de arraste à vapor. Já Moraes et al. (2012), obtiveram um rendimento de 0,8% para o óleo essencial de *L. sidoides* a partir das folhas da planta coletada em Hidrolândia no estado de Goiás.

Figueiredo et al., (2009) avaliaram o rendimento de óleo essencial de *Lippia sidoides* cultivada no Norte de Minas, sendo os tratamentos constituídos por intervalos de colheita de 120, 180, 240, 300 e 360 dias após o transplântio. Amostras do material fresco, contendo folhas e caules (cerca de 100 g), foram submetidas à extração e determinação do teor de óleo essencial, sendo encontrado o teor máximo de óleo essencial aos 180 dias e a produção média de óleo essencial por planta foi $2,34 \pm 1,15$ g.

Castelo et al., (2010) avaliou o rendimento dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado brasileiro, sendo o rendimento úmido calculado através da relação entre a massa do óleo e a massa de material vegetal utilizado, onde obteve o rendimento de 0,06% para *Baccharis* sp., 0,12% para *Blepharocalyx salicifolius*, 0,10% para *Protium ovatum* e 0,13% para *Psidium myrsinites*. Já Tavares et al., (2005) realizaram a análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae), coletadas durante o crescimento vegetativo e floração, sendo obtido rendimento médio (g/g de peso fresco) menor no período de floração (*L. alba* (1) 0,15% *L. alba* (2) 0,40% *L. alba* (3) 0,40%), quando comparado ao período vegetativo (*L. alba* (1) 0,30% *L. alba* (2) 0,50% *L. alba* (3) 0,60%).

5.2.4 Avaliação da composição química

5.2.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM)

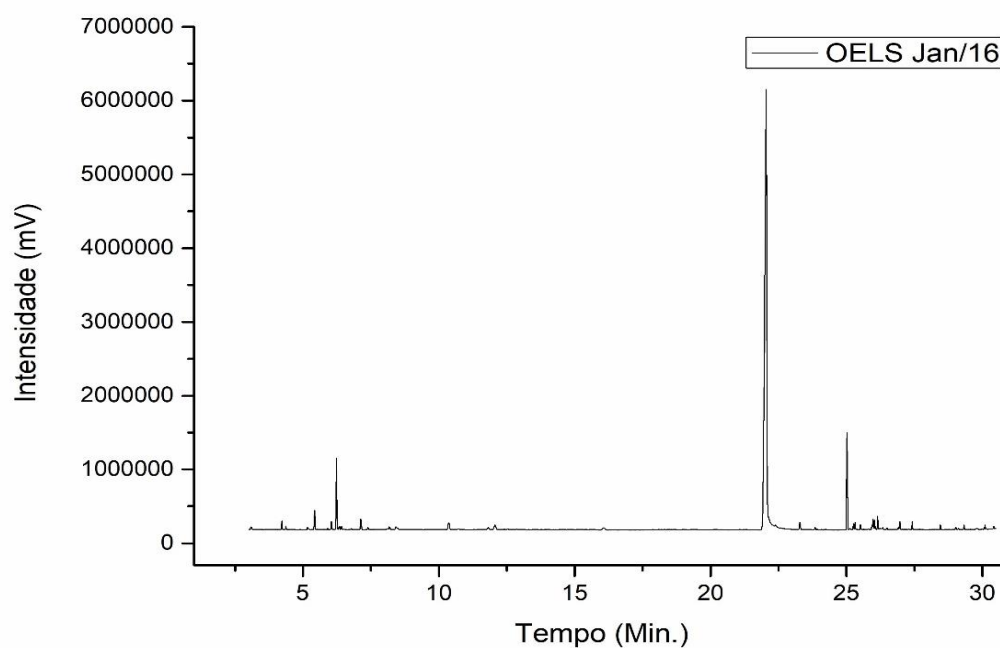
A análise do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. por CG-EM obtido a partir das partes aéreas da planta resultou na identificação de diversos compostos listados na Tabela 12, sendo o timol o componente majoritário, seguido do E-cariofileno, *p*-cimeno, β -mirceno e γ -terpineno. O cromatograma do óleo é apresentado na Figura 23.

Tabela 12 - Composição química do óleo essencial de *L. sidoides* Cham.

Componente	Tempo de retenção (minutos)	Concentração (%)
α -Tujeno	4.228	0,49
α -Pineno	4.375	0,21
β-Mirceno	5.432	1,16
Terpinoleno	6.047	0,54
<i>p</i>-Cimeno	6.234	4,62
<i>D</i> -Limoneno	6.338	0,22
Eucaliptol	6.421	0,21
β -Ocimeno	6.788	0,08
γ-Terpineno	7.133	0,82
<i>Cis</i> -beta-Terpineol	7.394	0,18
β -Linalol	8.423	0,24
Ipsidienol	10.364	0,81
Eucarvone	11.816	0,31
Terpinen-4-ol	12.062	0,64
Timol metil éter	16.071	0,42
Timol	22.044	76,29
Carvacrol	22.387	0,16
<i>E</i>-Cariofileno	25.016	5,28
<i>Cis</i> -alfa-Bergamoteno	25.250	0,32
Aromadendreno	25.306	0,39
α -Humuleno	25.512	0,28
Viridifloreno	26.032	0,45
β -Bisaboleno	26.144	0,65
Óxido de Cariofileno	26.956	0,45

Componentes listados em ordem de eluição.

Figura 23 - Cromatograma do OELS (Janeiro/2016) por CG-EM.



A análise da composição química do óleo essencial por CG-EM possibilitou a identificação de seus componentes em cada mês do estudo. O componente majoritário em todas as amostras foi o timol, seguido do E-cariofileno, *p*-cimeno, β -mirceno e γ -terpineno (Tabela 13), porém ocorreram variações tanto qualitativas como quantitativas na composição dos óleos. O coeficiente de variação foi calculado, demonstrando que os teores se apresentaram bastante homogêneos durante o período considerado, sendo o coeficiente de variação do timol 7,34%.

Tabela 13 - Composição química do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. no período de janeiro a dezembro de 2016.

Componente	Concentração (%)											
	Mês											
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
α -Tujeno	0,49	0,97	---	0,37	0,45	0,19	---	0,88	0,32	1,03	0,98	1,05
α -Pino	0,21	0,39	---	0,30	0,24	---	---	0,31	---	0,33	0,30	0,33
Octen -3-ol	---	0,07	0,32	0,25	0,30	0,35	0,26	---	---	---	---	---
β -Mirreno	1,16	2,08	0,82	1,20	1,06	0,64	---	1,39	0,92	1,64	1,86	1,86
Terpinoleno	0,54	1,04	0,42	0,37	0,42	0,26	---	0,86	0,43	0,88	0,90	0,93
<i>p</i> -Cimeno	4,62	8,07	5,50	7,28	6,17	5,12	0,64	5,55	6,10	5,52	5,33	5,86
<i>D</i> -Limoneno	0,22	0,40	---	0,27	0,19	0,14	---	0,33	---	0,30	0,31	0,34
Eucaliptol	0,21	0,21	0,42	0,43	0,56	0,62	0,59	0,70	1,16	0,60	0,26	0,26
β -Ocimeno	0,08	0,25	---	---	---	---	---	0,39	---	0,41	0,34	0,33
γ -Terpineno	0,82	1,94	0,42	---	0,26	---	---	2,46	---	2,37	2,38	2,52
<i>Cis</i> -beta-Terpineol	0,18	---	---	0,27	---	0,32	0,39	0,33	---	0,35	0,29	0,35
β -Linalol	0,24	---	---	---	---	---	---	0,31	---	0,34	0,31	0,32
Ipsidienol	0,81	---	1,26	0,87	0,97	1,18	1,38	0,91	---	1,03	0,88	0,92
Eucarvone	0,31	---	---	---	---	---	---	0,23	---	0,28	0,30	0,25
Terpinen-4-ol	0,64	---	0,80	---	0,67	0,57	0,55	0,47	---	0,48	0,53	0,54
Timol metil éter	0,42	---	---	---	---	---	---	0,22	---	0,47	0,49	0,54
Timol	76,29	67,69	73,80	76,69	77,39	79,30	85,67	70,52	77,51	67,14	70,77	69,65
Carvacrol	0,16	---	0,28	---	---	---	0,16	0,24	---	0,38	0,33	0,27
Acetato de timol	---	0,50	0,40	0,34	0,31	0,34	0,45	---	---	---	---	---
<i>E</i> -Cariofileno	5,28	7,10	8,29	6,01	6,51	6,16	5,17	4,78	6,66	6,29	5,02	5,02
<i>Cis</i> -alfa-Bergamoteno	0,32	0,41	0,44	0,29	0,28	0,23	0,17	0,17	---	0,24	0,24	0,24
Aromadendreno	0,39	0,50	0,61	0,48	0,52	0,55	0,49	0,26	0,52	0,29	0,26	0,24
α -Humuleno	0,28	0,42	0,39	0,29	0,31	0,30	0,27	0,26	0,34	0,35	0,29	0,30
Germacreno D	---	---	---	---	---	---	---	0,42	---	0,27	---	0,08
Viridiflore	0,45	0,66	0,82	0,60	0,63	0,69	0,64	---	0,77	---	---	---
Germacreno B	---	---	---	---	---	---	---	0,89	---	1,14	0,80	0,83
β -Bisaboleno	0,65	0,90	0,95	0,69	0,72	0,59	0,47	0,42	0,45	0,49	0,53	0,58
Delta cadideno	---	0,32	0,44	0,20	0,20	0,29	0,25	---	0,54	---	---	---
(-) - Epatulenol	---	---	0,18	0,21	0,18	0,23	0,22	---	---	---	---	---
α -Bisaboleno	---	0,17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Óxido de Cariofileno	0,45	0,53	1,00	1,11	1,12	0,74	0,60	0,31	0,96	0,30	0,24	0,26

Componentes listados em ordem de eluição da coluna.

As amostras de óleo essencial foram armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) e analisadas novamente após cerca de 1 ano, seguindo a mesma metodologia, para verificação da estabilidade dos componentes majoritários da amostra, em especial o timol. Os resultados são apresentados na Tabela 15. Observam-se baixos valores de coeficiente de variação e consistência nas concentrações dos componentes majoritários em relação ao tempo de armazenamento. O timol apresentou coeficiente de variação entre 2,60 e 5,96%, e γ -terpineno e β -mirceno apresentaram um decréscimo com o passar do tempo.

A amostra referente ao mês de janeiro de 2016, que foi utilizada para as análises de validação da metodologia de quantificação do marcador timol no óleo essencial por CG-DIC, foi submetida em diferentes períodos ao método validado e assim foi possível a verificação da estabilidade da amostra que estava armazenada sob refrigeração. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos.

Tabela 14 – Teor de timol (%) no óleo essencial de *L. sidoides* Cham. por CG-DIC. Amostra de Janeiro de 2016.

Período de análise	Teor de timol (%)
04/2016	71,66
06/2016	72,85
07/2016	73,80
07/2016	75,30
02/2017	77,30
03/2017	69,87
03/2017	71,18
05/2017	69,87
05/2017	74,02
Média	73,20
DP	2,69
CV(%)	3,67

Tabela 15 - Comparação da composição química do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. em dois períodos de análise (2017 e 2018) por CG-EM.

Componente	Janeiro		Variação percentual	Agosto		Variação percentual	Outubro		Variação percentual	Novembro		Variação percentual
	2017	2018		2017	2018		2017	2018		2017	2018	
Timol	76,29	78,66	3,11	70,52	74,72	5,96	67,14	69,53	3,56	70,77	72,61	2,60
<i>E</i>-Cariofileno	5,28	7,32	38,64	4,78	6,2	29,71	6,29	7,83	24,48	5,02	6,7	33,47
<i>p</i>-Cimeno	4,62	5,38	16,45	5,55	6,97	25,59	5,52	5,91	7,07	5,33	5,95	11,63
β-Mirceno	1,16	1,15	-0,86	1,39	1,38	-0,72	1,64	1,56	-4,88	1,86	1,67	-10,22
γ-Terpineno	0,82	0,33	-59,76	2,46	1,42	-42,28	2,37	1,96	-17,30	2,38	2,42	1,68
Ipsidienol	0,81	---	---	0,91	---	---	1,03	---	---	0,88	---	---
β -Bisabolenol	0,65	0,99	52,31	0,42	0,54	28,57	0,49	0,65	32,65	0,53	0,79	49,06
Terpinen-4-ol	0,64	---	---	0,47	---	---	0,48	---	---	0,53	---	---
Terpinoleno	0,54	0,46	-14,81	0,86	0,77	-10,47	0,88	0,86	-2,27	0,9	0,94	4,44
α -Tujeno	0,49	0,36	-26,53	0,88	0,84	-4,55	1,03	1,08	4,85	0,98	0,98	0,00
Viridifloreol	0,45	0,65	44,44	---	0,76	---	---	---	---	---	0,79	---
Óxido de Cariofileno	0,45	0,8	77,78	0,31	0,53	70,97	0,3	0,42	40,00	0,24	0,33	37,50
Timol metil éter	0,42	---	---	0,22	---	---	0,47	---	---	0,49	---	---
Aromadendreno	0,39	0,53	35,90	0,26	0,53	103,85	0,29	0,45	55,17	0,26	0,48	84,62
<i>Cis</i> -alfa-Bergamoteno	0,32	0,43	34,38	0,17	0,26	52,94	0,24	0,29	20,83	0,24	0,34	41,67
Eucarvone	0,31	---	---	0,23	---	---	0,28	---	---	0,3	---	---
α -Humuleno	0,28	0,42	50,00	0,26	0,35	34,62	0,35	0,44	25,71	0,29	0,37	27,59
β -Linalol	0,24	---	---	0,31	---	---	0,34	---	---	0,31	---	---
<i>D</i> -Limoneno	0,22	---	---	0,33	---	---	0,3	0,28	-6,67	0,31	0,31	0,00
α -Pino	0,21	0,26	23,81	0,31	0,34	9,68	0,33	0,35	6,06	0,3	0,32	6,67
Eucaliptol	0,21	0,23	9,52	0,7	0,67	-4,29	0,6	0,61	1,67	0,26	0,28	7,69
<i>Cis</i> -beta-Terpineol	0,18	---	---	0,33	---	---	0,35	---	---	0,29	---	---
Carvacrol	0,16	---	---	0,24	---	---	0,38	---	---	0,33	---	---
β -Ocimeno	0,08	---	---	0,39	0,2	-48,72	0,41	0,34	-17,07	0,34	0,35	2,94
Acetato de timol	---	---	---	---	0,33	---	---	0,48	---	---	0,43	---
Germacreno D	---	---	---	0,42	---	---	0,27	0,25	-7,41	---	---	---
Germacreno B	---	---	---	0,89	---	---	1,14	1,16	1,75	0,8	---	---
Delta cadideno	---	---	---	---	0,29	---	---	---	---	---	---	---

Os resultados obtidos indicam que o período em que a planta é coletada é muito importante, devido às variações que ocorrem ao decorrer do ano, podendo interferir na composição química de seus metabólitos secundários de forma quantitativa e qualitativa. Estas variações químicas acontecem em resposta às condições ambientais em que a planta está submetida no ambiente onde está se desenvolvendo (CERQUEIRA et al., 2009).

De acordo com Taiz e Zeiger (2004), na dinâmica de crescimento e desenvolvimento, as plantas medicinais e/ou aromáticas apresentam alterações bioquímicas e fisiológicas capazes de modificar a elaboração de substâncias biologicamente ativas, tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, influenciando diretamente no rendimento e na qualidade dos óleos essenciais.

No estudo de Oliveira et al. (2014), a análise química do óleo essencial de *L. sidoides* Cham., proveniente do Ceará, estado do nordeste brasileiro, também encontrou como componente majoritário o timol (70,97%), além de cariofileno (8,30%), *p*-cimeno (7,51%) e mirceno (2,12%). Corroborando com esses estudos, Cavalcante et al. (2004), encontraram no óleo essencial de plantas dessa espécie, na região nordeste do Brasil, o timol como componente majoritário (80,8%), seguido pelo *p*-cimeno (8,6%), E-cariofileno (5,1%), γ -terpineno (1,6%), 1,8-cineol (1,3%) e β -mirceno (0,9%). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Fontenelle et al. (2007), que analisando o OELS, também coletada no estado do Ceará, encontraram como componente majoritário o timol (59,65%), seguido pelo E-cariofileno (10,6%) e *p*-cimeno (9,08%), assim como, os obtidos por Botelho et al. (2007a) que identificaram como constituintes majoritários do óleo essencial dessa espécie, também do nordeste, o timol (56,67%) e carvacrol (16,73%), seguidos pelo *p*-cimeno (7,13%), timol metil éter (5,06%), aromadendreno (2,79%), 1,8-cineol (2,39%), γ -elemeno (2,28%) e γ -terpineno (1,42%) e Monteiro et al. (2004), que estudando essa espécie também do Ceará, encontrou timol (66,67%), E-cariofileno (11,73%), *p*-cimeno (7,13%) e γ -terpineno (4,06%) como componentes majoritários.

No entanto, em regiões distintas do nordeste brasileiro, Cavalcanti et al. (2010), estudando o óleo essencial de *L. sidoides* Cham., encontraram o carvacrol (46,09%) seguido pelo γ -terpineno (15,49%) e pelo *p*-cimeno (15,06%) como constituintes majoritários. A presença do carvacrol, que é isômero do timol, como componente

majoritário, também foi observado por Guimarães et al. (2014) que estudaram o óleo essencial desta mesma planta nativa de Minas Gerais, encontrando o carvacrol (26,44%) e o 1,8-cineol (22,63%) como constituintes majoritários e por Lima et al. (2011) que estudando o óleo de *L. sidoides* Cham. em Lavras-MG, encontraram o carvacrol (31,68%), o p-cimeno (19,58%), o 1,8-cineol (9,26%) e o γ -terpineno (9,21%) como componentes majoritários.

Diversos fatores podem estar envolvidos com estas variações na composição química e quantificação de componentes. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), vários fatores influenciam o conteúdo de metabólitos secundários, como a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e índice pluviométrico, intensidade e quantidade de incidência luminosa, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e também a indução por estímulos externos ou ataques de patógenos. Para Moraes (2009), o teor e a composição química dos óleos essenciais são determinados por fatores genéticos, que associados a diversas condições ambientais podem gerar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários devido a interface química entre as plantas e o ambiente, podendo resultar no redirecionamento da rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, levando a alterações significativas no teor, qualidade e concentração de princípios ativos de interesse nos óleos essenciais. Importante ressaltar que estes fatores podem estar interligados entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário.

5.2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A presença de timol no OELS foi confirmada através da análise do RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos padrões e das amostras, uma vez que os sinais característicos dessa substância foram observados nos espectros do óleo, sendo esses, três sinais na região de prótons aromáticos, um duplo dubleto em δ_{H} 7,13 (1H, $J = 1,6$ e $7,6$ Hz; H-6), um dubleto em δ_{H} 6,78 (1H, $J = 7,6$ Hz; H-5) e um singlete em δ_{H} 6,61 (1H; H-2), um sinal em δ_{H} 4,72 (1H, s; OH), característico de hidrogênio de hidroxila, dois multipletos em δ_{H} 3,22 (1H; H-8) e δ_{H} 1,29 (6H, H-9 e H-10), característicos de grupo isopropil e um singlete em δ_{H} 2,32 (3H; H-7), característico de metila ligada a anel aromático. O espectro de

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) também corroborou com a presença do timol ao apresentar seis sinais característicos de carbonos aromáticos, sendo três metínicos (δ_{C} 126,44; 121,88; 116,24) e três não hydrogenados (δ_{C} 152,71; 136,80; 131,55), dois sinais em δ_{C} 26,92, para um carbono, e em δ_{C} 22,88, para 2 carbonos, atribuídos ao grupo isopropil e um sinal em δ_{C} 21,06, atribuído a metila ligada ao anel aromático. Os espectros são apresentados nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do OELS e do timol.

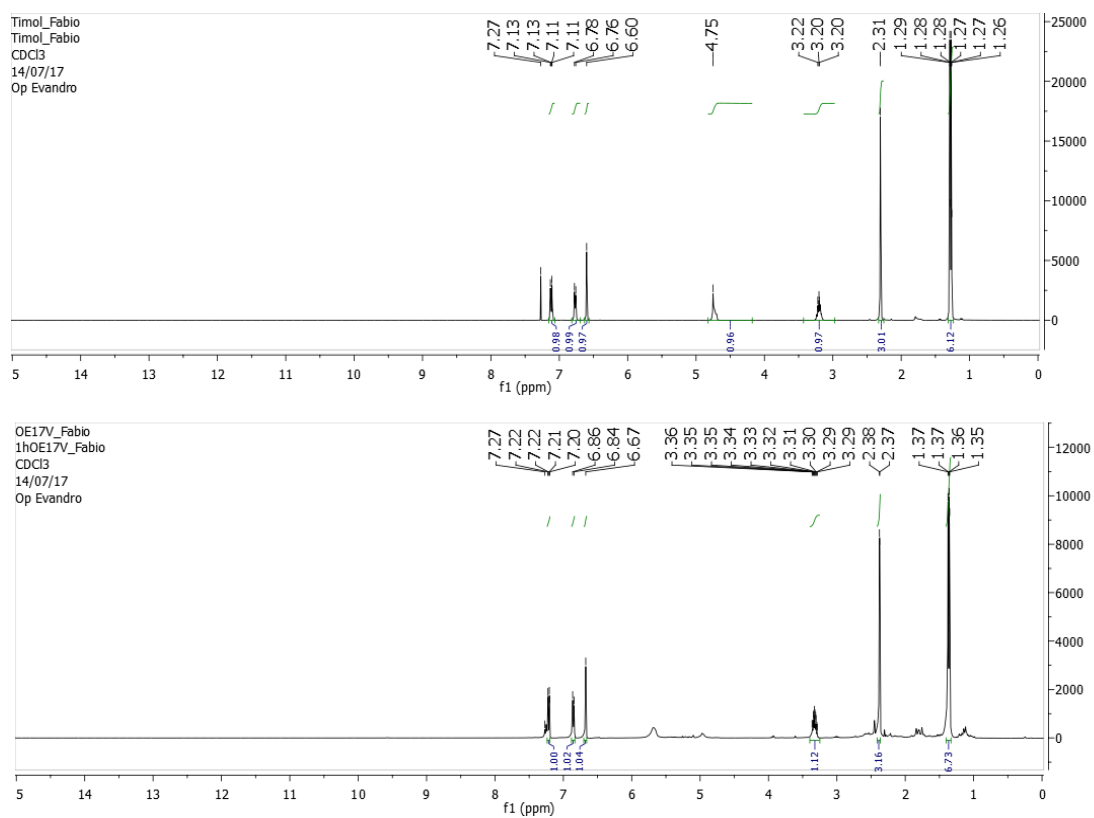
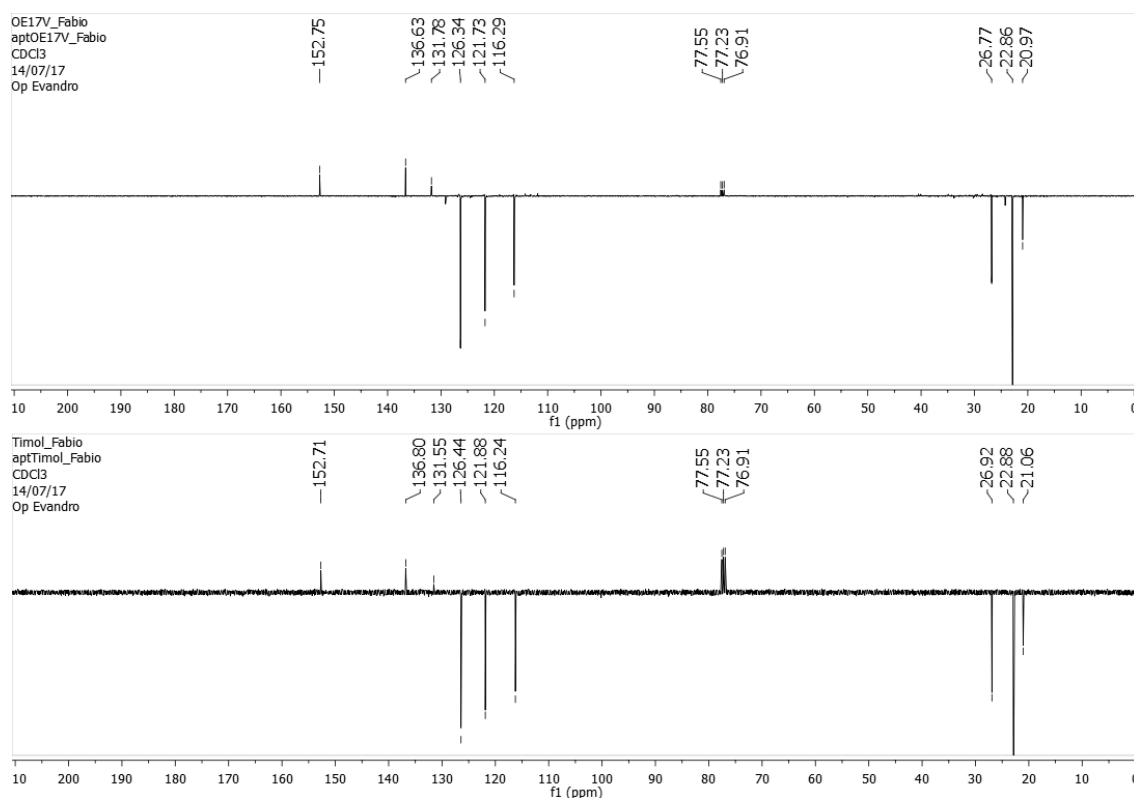


Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do OELS e do timol.



A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada por Castelo et al. (2010) para a identificação dos grupos funcionais presentes nos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado brasileiro (*Baccharis* sp., *Blepharocalyx salicifolius*, *Psidium myrsinites* e *Protium ovatum*). Lemos et al. (2007) utilizaram a RMN para investigação fitoquímica das partes aéreas e raízes das espécies *Lippia sidoides* e *Lippia microphylla*, o que permitiu caracterizar vários metabólitos como flavonóides, quinonas, triterpenos e lignanas.

5.3 Conclusão

Para o estudo de sazonalidade, inicialmente foi realizada uma análise exploratória de dados a fim de caracterizar a amostra. Com base nos resultados verificou-se que o percentual de rendimento médio durante o período analisado foi de $1,13 \pm 0,38$, enquanto o teor de timol médio foi de $67,7 \pm 7,66$. Além disso, foi identificado através das séries históricas das variáveis climáticas que houve um comportamento crescente do percentual

de rendimento e estacionário para o teor de timol, também evidenciado pelo coeficiente de variação de 3,10%.

No sentido de avaliar relações entre as variáveis climáticas e as variáveis dependentes teor de timol e rendimento foram ajustados modelos de regressão entre essas variáveis. Uma vez que os dados são limitados no intervalo unitário, ou seja, dados do tipo proporção, optou-se pelo modelo de regressão beta alternativamente ao modelo normal linear devido à sua flexibilidade. Os resultados do modelo permitiram identificar que a variável temperatura mínima (p-valor = 0,0000) foi significativa para o teor do timol ao nível de significância de 5%. Além disso as variáveis temperatura máxima (p-valor = 0,0006) e umidade relativa do ar (p-valor = 0,0001) foram consideradas fatores importantes na explicação da dispersão dos dados. No que se refere ao percentual de rendimento, apenas a variável temperatura máxima foi significativa ao nível de 5%.

A análise da composição química do óleo essencial por CG-EM realizada mensalmente durante o período de um ano, possibilitou a identificação de seus componentes e as variações qualitativas e quantitativas na composição ocorridas em cada mês do estudo. Foi verificado que o componente majoritário em todas as amostras foi o timol, seguido do E-cariofileno, *p*-cimeno, β -mirceno e γ -terpineno e que os teores se apresentaram homogêneos durante o período considerado.

CAPÍTULO IV

6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM., *CYMBOPOGON CITRATUS* E *CITRUS LIMON*.

6.1 Materiais e Métodos

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica realizados incluíram as técnicas de difusão em ágar, microdiluição em placas de 96 poços e o método de *checkerboard*. Todos os ensaios foram realizados no LABIAL, utilizando capela de fluxo laminar e materiais previamente autoclavados.

6.1.1 Materiais

Solução salina 0,9% obtida a partir de NaCl (Sigma[®]), BHI caldo e BHI ágar (Brain Heart Infusion, Kasvi[®] Brasil) Sabouraud caldo, Sabouraud ágar (Kasvi[®] Brasil), solução de clorexidina 0,12% (Sigma[®]), Tween[®] 80 5% (Sigma[®]), resazurina 0,01% (Sigma[®]), OELS, OECC e OECL, sendo o primeiro extraído na UFPB e os dois últimos fornecidos pela Quinarí.

6.1.1.1 Microrganismos do estudo

Os óleos essenciais foram testados frente aos microrganismos oriundos da American Type Culture Collection (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 27853), *Streptococcus mutans* (ATCC[®] 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 15656) e *Candida albicans* (ATCC[®] 76485), todos fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

6.1.2 Cultivo e preparação do inóculo para os testes microbiológicos

A cepa de cultura-estoque mantida em congelador foi retirada e deixada em repouso em bancada de fluxo laminar para atingir a temperatura ambiente (TA), sendo posteriormente transferido 0,3 mL (300 µL) do inóculo para um tubo de ensaio esterilizado, contendo 7mL (7000µL) de meio BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi[®]) para as bactérias e Sabouraud dextrose para o fungo. Este tubo foi incubado a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, por 24 ou 48h, dependendo do microrganismo. Após este período foi centrifugado por 10

minutos para retirada do sobrenadante e ressuspendido em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ajustada por espectrofotômetro FLUORstar OPTIMA[®], sendo a absorbância observada em um comprimento de onda de 540nm, até a obtenção de uma suspensão padronizada equivalente a 0,5 da escala McFarland (equivalente a aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônias – UFC.mL⁻¹ para bactérias e 10^6 UFC.mL⁻¹ para fungos).

6.1.3 Atividade antimicrobiana

6.1.3.1 Ensaio de difusão em ágar

Para os testes de difusão em ágar foi vertido cerca de 15 mL de BHI ágar em placas de petri. Após a solidificação do meio, o inóculo foi colocado na placa por imersão, produzindo uma camada uniforme de inóculo (previamente padronizado) em toda superfície do meio. Sobre o meio plaqueado foram colocados discos estéreis de papel filtro de aproximadamente 6 mm de diâmetro imersos no OELS nas concentrações de 50 e 100%, até atingir a saturação ($\pm 5 \mu\text{L}$). Como controle positivo foram utilizados discos contendo 5 μL de solução de digluconato de clorexidina 0,12%. As medidas dos halos de inibição (mm) foram realizadas após 24h (*S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e 48h (*C. albicans*) (BAUER *et.al.*, 1966). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Posteriormente, esse procedimento foi realizado fazendo poços nas placas para testar os OELS (0,1; 0,25; 0,5 e 1%), OECC (0,2 e 0,3%) e OECL (0,1 e 0,2%), sendo usado 50 μL em cada poço. O inóculo foi colocado na placa por imersão, sendo usado como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo o Tween[®] 80 5%.

6.1.3.2 Ensaio de microdiluição

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do OELS, OECC e OECL foi realizada a técnica de microdiluição. Para esta técnica foram seguidas as instruções do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (antigo NCCLS,

2002) e Sampaio et al. (2009) adaptadas no Protocolo para a técnica de microdiluição para bactérias aeróbias, microaerófilas e anaeróbias do LABIAL.

Os valores da CIM para os óleos essenciais foram determinados visualmente através da prova da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), um indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha ou rosado (RAMPERSAD, 2012).

Os óleos essenciais foram inicialmente solubilizados em Tween 80[®] 5%, dando origem à solução mãe zero (SM0) com concentração definida a partir da densidade de cada óleo. Partindo da solução SM0, foram feitas diluições em BHI caldo ou Sabouraud caldo, constituindo as soluções mãe 1 (SM1), 2 (SM2), 3 (SM3) e quando necessário, solução mãe 4 (SM4) e 5 (SM5). Como controle positivo foi utilizada a solução de clorexidina 0,12% e como controle negativo o Tween 80[®] 5%.

Para execução da técnica de microdiluição foi utilizada microplaca esterilizada com fundo “U” de 96 poços distribuídos em 8 linhas e 12 colunas. Em cada poço foi adicionado volumes crescentes do meio de cultura e volumes decrescentes da SM1, SM2 e SM3. Em cada poço foi adicionado por último o inóculo bacteriano e fúngico padronizados equivalente a 20% (20 µL) do volume total de cada poço, totalizando 100 µL. As concentrações finais do óleo para cada poço variaram de 188,64 a 0,07 mg.mL⁻¹ para OELS, 179 a 0,14 mg.mL⁻¹ para OECC e 169,60 a 1,06 mg.mL⁻¹ para OECL.

Após a preparação das microplacas, estas foram tampadas e incubadas a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante 24 ou 48h, dependendo do microrganismo. Logo após o período de incubação foi adicionado em cada poço da microplaca 35 µL de resazurina a 0,01%, sendo as placas reicubadas por 30 minutos a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ para obtenção da CIM através da análise visual. A coloração azul indicou ausência de crescimento bacteriano enquanto a cor vermelha ou rósea indicou a presença de células viáveis para crescimento. Em seguida, foram transferidos 10 µL da cavidade correspondente a CIM, assim como dos três poços anteriores e dois poços posteriores a CIM, para placas com BHI ágar ou Sabouraud dextrose, utilizando o método da gota, incubando as placas a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Após este período, o crescimento microbiano foi avaliado e a CBM e CFM foram

determinadas como a menor concentração do óleo essencial em que não foi observado crescimento microbiano. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

6.1.3.3 Método de Checkerboard

Utilizando a técnica de microdiluição *checkerboard* descrita por Eliopoulos et al. (1988), as combinações dos três óleos essenciais foram testadas, dois a dois, (OELS x OECC, OELS x OECL e OECC x OECL) em duplicata, frente a cada microrganismo do estudo.

Cada óleo foi testado em diferentes concentrações a partir da CIM obtida em ensaios anteriores para cada microrganismo, sendo preparadas as soluções iniciais na concentração correspondente à 4 x CIM, considerando a densidade de cada óleo essencial. Na placa de 96 poços de fundo em “U” foram realizadas as diluições de forma a se obter as concentrações equivalentes à 4 x CIM, 2 x CIM, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8, CIM/16 e CIM/32.

Inicialmente, 100 µL de caldo BHI foram adicionados nos poços das placas de microdiluição. O primeiro óleo teve sua concentração decrescente da esquerda para direita no sentido vertical e o segundo óleo teve sua concentração decrescente de cima para baixo no sentido horizontal da placa. A diluição foi realizada de forma que cada poço apresentasse as duas substâncias de forma combinada e com concentrações definidas. Por fim, adicionou-se 20 µL da suspensão bacteriana previamente padronizada. As placas foram incubadas a 35-37 °C por 24–48h e depois avaliadas quanto ao crescimento bacteriano. A viabilidade celular foi visualizada pelo indicador redox sensível à resazurina.

Os índices de concentração inibitória fracionada (CIF) foram calculados para avaliar a interação de cada combinação dos óleos essenciais. O ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) foi calculado através da soma do CIFA+CIFB, onde A representa o primeiro óleo e B representa o segundo óleo. O CIF é calculado através da relação CIM A combinado/CIM A sozinho, enquanto o CIF B = CIM B combinado/CIM B sozinho. Este índice é interpretado conforme o resultado obtido, onde: $CIF \leq 0,5$

(sinergismo); $CIF > 0,5$ e < 1 (aditividade); $CIF \geq 1$ e < 4 (indiferença) e $CIF \geq 4$ (antagonismo) (LEWIS et al., 2002; BERDITSCH, et al., 2015).

6.1.4 Citotoxicidade

6.1.4.1 Teste da membrana corioalantóide do ovo da galinha (HET-CAM)

O teste de citotoxicidade, usando ovos de galinha (HET-CAM) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Steiling et al. (1999).

As amostras de óleo essencial foram diluídas com Tween 80[®] 5% para atingir as concentrações do estudo (OELS 0,25 e 0,5%, OECC 0,3% e OECL 0,2%).

Para realização do teste, ovos no nono e décimo dias de incubação foram utilizados. Com uma pinça, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido, expondo a membrana corioalantóide que foi umedecida com solução salina a 0,9% e cuidadosamente removida.

Uma alíquota de 200 µL das substâncias teste foi aplicada na membrana corioalantóide do ovo fertilizado e examinado os efeitos irritantes (hemorragia, coagulação e vasoconstrição) por um período de 5 minutos (Figura 26), sendo observado e registrado o tempo (em segundo) que os processos de hemorragia, coagulação e vasoconstrição iniciavam. Os tempos (em segundos) registrados em que se iniciavam os processos foram posteriormente inseridos na fórmula abaixo:

$$IS = \frac{[(301 - \text{hemorragia}) \times 5] + [(301 - \text{vasoconstrição}) \times 7] + [(301 - \text{coagulação}) \times 9]}{300}$$

300

Onde:

Hemorragia representa o tempo que iniciou o processo de hemorragia sanguínea; vasoconstrição representa o tempo que iniciou a vasoconstrição dos vasos e coagulação representa o tempo que iniciou a coagulação.

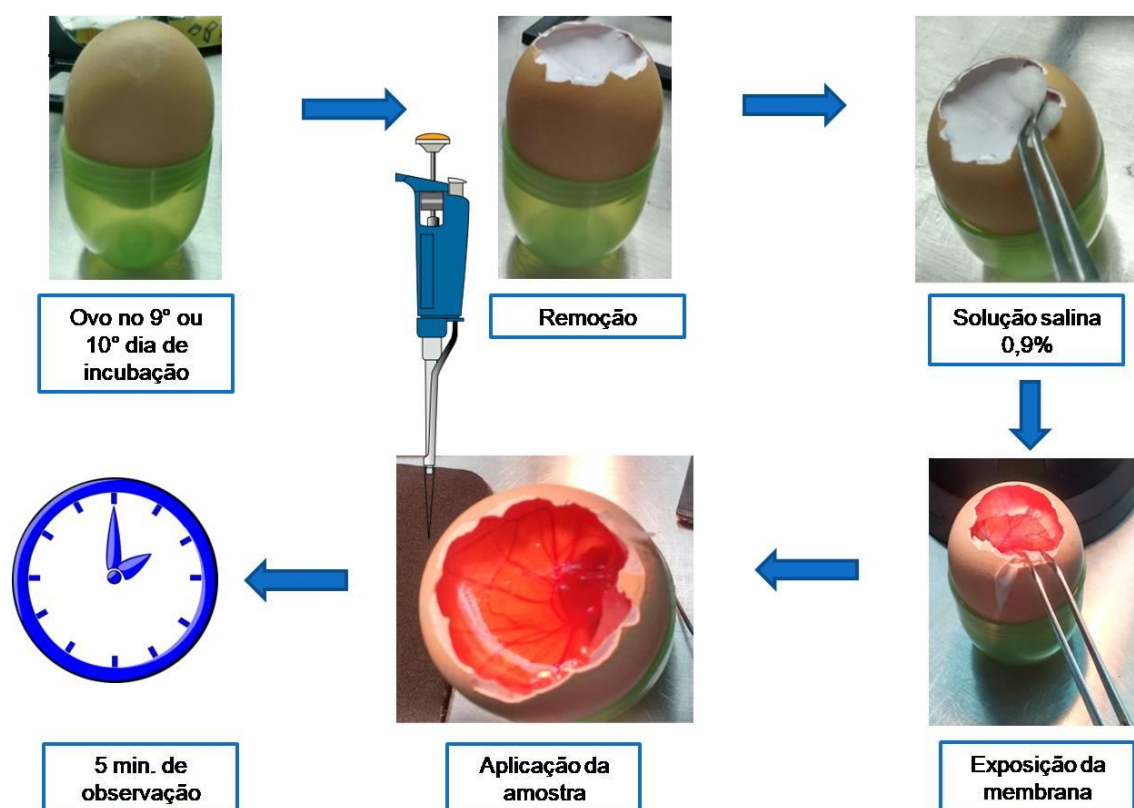
Após aplicação da fórmula anteriormente mencionada é possível quantificar o potencial de irritação observado e obter a média $\pm$ desvio padrão da média para realizar a análise conforme classificação do potencial de irritação no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação do potencial de irritação.

FAIXA DE PONTUAÇÃO	CATEGORIA DE IRRITAÇÃO
0 - 0,9	Não irritante
1 - 4,9	Ligeiramente irritante
5 - 8,9	Irritante
9 - 21	Muito irritante

Fonte: (STEILING et al., 1999)

Figura 26 - Teste da membrana corialantóide do ovo da galinha (HET-CAM).



Fonte: Próprio autor

6.1.4.2 Teste de hemólise

Para a avaliação *in vitro* da citotoxicidade hemolítica dos óleos essenciais em estudo foi preparada uma suspensão de hemácias obtidas do sangue humano, sendo necessário amostras de sangue dos tipos O, A e B que foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas (Hemoclin), localizado em Campina Grande – PB. O sangue fornecido seria descartado, pois normalmente é coletada uma quantidade maior de sangue do que é necessário para a realização dos exames laboratoriais. A amostra foi obtida de pacientes adultos acima de 18 anos, sem anemia, ou seja, que apresentem hematócrito igual ou superior a 35%, sendo excluídas as crianças e adolescentes pela maior possibilidade destes pacientes apresentarem medição de hematócrito abaixo de 35%, porém a identificação e nenhuma outra informação desses pacientes foram informadas pelo laboratório.

Para realização do teste de hemólise, preparou-se uma suspensão de hemácias humanas de cada tipo a 5% (O, A e B), colocando 2 mL de hemácias em um tubo e completando com solução salina. Este tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos e após o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido 3 vezes para lavagem das hemácias. Em seguida, o sedimento da última centrifugação foi ressuspensionado com solução salina, de forma a se obter uma suspensão a 5%.

Para cada concentração de óleo essencial a ser testada, 250 µL foi retirado e colocado em um tubo onde se adicionou 250 µL da suspensão de hemácia preparada anteriormente. Para o controle negativo, foi utilizado 250 µL de solução salina e 250 µL de suspensão de hemácias, onde se espera que ocorra 0% de hemólise. Já para o controle positivo, usou-se o Triton-X-100 a 1% no lugar da solução salina, resultando em 100% de hemólise.

Os tubos contendo as amostras e os controles foram incubados sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1 hora a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos, sendo retirado 100 µL do sobrenadante de cada amostra e colocado em um placa de 96 poços para avaliação e quantificação da hemólise por espectrometria em um comprimento de onda de 560 nm (FLUORstar OPTIMA®), usando a solução salina como branco. Os resultados foram expressos em porcentagem do

grau de hemólise, considerando como referência o valor obtido com o controle positivo (Triton-X-100), sendo considerado elevado quando acima de 15%.

Esta etapa da pesquisa apresenta parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFPB para sua execução.

6.1.4.3 Bioensaio com *Artemia salina*

Para a realização do bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi utilizada a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982) com algumas adaptações. Foi preparada uma solução com sal marinho na concentração de 30 g.L⁻¹, sendo o pH ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por um período de 48 horas, com aeração constante a 25°C. Aproximadamente 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para a placa de 96 poços, contendo a solução salina e amostras a serem testadas. Foi testado o óleo essencial de *L. sidoides* Cham., nas concentrações 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg.mL⁻¹, solubilizados com DMSO (0,01 – 1%).

6.2 Resultados e Discussão

6.2.1 Atividade antimicrobiana

6.2.1.1 Ensaio de difusão em ágar

Os resultados da análise da atividade antimicrobiana do OELS pelo método de difusão em ágar com disco estão representados na Tabela 16. Os halos de inibição variaram de 22 à 28,7 mm para OELS a 50 % e 29,7 à 33,3 mm para o OELS a 100 %. Podemos observar que o óleo não diluído (100 %), inibiu totalmente o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans* e promoveu inibição do crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Já na concentração de 50 %, promoveu inibição do crescimento de *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e inibiu totalmente o crescimento de *C. albicans*.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidodes* Cham. (OELS) pelo método de difusão em ágar.

Medida do halo de inibição (mm)*				
Concentração	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
OELS 50 %	28,7 ± 1,15	24,7 ± 1,15	22,0 ± 1,00	SC
OELS 100 %	SC	33,3 ± 0,58	29,7 ± 1,53	SC

*Média de três repetições ± desvio padrão; SC = Sem crescimento fúngico ou bacteriano.

Pelo método de difusão em poços, também foram testados o OELS (0,1; 0,25; 0,5 e 1 %), o OECC (0,2 e 0,3 %) e o OECL (0,1 e 0,2 %), sendo usado como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina 0,12 % e como controle negativo o Tween® 80 5%. Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de OELS, OECC e OECL pelo método de difusão em ágar. A clorexidina (CLX) 0,12 % usada como controle positivo e o Tween® 80 5 % como controle negativo.

Medida do halo de inibição (mm)*				
Amostra	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
OELS 100 %	SC	40,0	ND	15,0
OELS 0,1 %	ND	ND	16,0	ND
OELS 0,25 %	ND	ND	11,5	ND
OELS 0,5 %	ND	ND	15,0	ND
OELS 1 %	ND	ND	>15,0	ND
OECC 100 %	21,0	42,0	SC	SC
OECC 0,2 %	20,0	32,0	15,5	SC
OECC 0,3 %	19,0	24,0	SC	SC
OECL 100 %	10,0	15,0	SC	SC
OECL 0,1 %	0,0	0,0	15,0	8,0
OECL 0,2 %	0,0	0,0	SC	9,5
CLX 0,12 %	23,5	18,0	14,0	15,0
Tween® 80 5 %	0,0	0,0	0,0	0,0

*Média de três repetições; SC = Sem crescimento fúngico ou bacteriano; ND = Não definido.

A partir dos resultados podemos observar que o OECL não promoveu inibição do crescimento para *S. mutans* e *S. aureus* tanto na concentração 0,1% quanto 0,2%. No entanto apresentou inibição do crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*, sendo que na

concentração de 0,2% inibiu completamente o crescimento de *P. aeruginosa*. Já o OECC (0,2 e 0,3%), inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, apresentando total inibição para *C. albicans* nas duas concentrações e para *P. aeruginosa* na concentração de 0,3%. Para o OELS, pela técnica aplicada não foi possível a definição dos halos nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 1 % com exceção do observado para *P. aeruginosa*.

Como a técnica utilizada neste estudo foi por difusão em ágar, e o fenômeno da difusão depende das propriedades físico-químicas do produto e do meio de cultura, a ausência da formação de halos de inibição de crescimento poderia estar associada ao grau de difusão dos óleos essenciais em ágar, não estando obrigatoriamente relacionada com a ausência de atividade antimicrobiana. Não há critérios para a interpretação dos testes de difusão de produtos naturais quando se utiliza o método de difusão do disco, pois estes revelam apenas a zona de inibição como indicativo de resultado, podendo problemas técnicos contribuir para a falta de precisão destes testes como a polaridade do composto natural que pode influenciar na extensão da difusão (ELSHIKH et al., 2016).

No estudo de Cavalcanti et al. (2012), foram testados diversos óleos essenciais, incluindo o óleo de *C. limon*, para verificação da atividade antimicrobiana sobre as cepas de *Candida* pelo método da difusão em meio sólido, por disco-difusão. Os resultados apresentados demonstraram que o óleo de limão siciliano apresentou atividade antifúngica, sendo as medidas do halo de inibição de 9,0, 8,0 e 8,0 mm para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. crusei* respectivamente. Em nosso estudo encontramos halos de inibição de 8,0mm para OECL 0,1 % e 9,5 mm para OECL 0,2 % sobre a cepa de *C. albicans*.

6.2.1.2 Ensaio de microdiluição

Os resultados da análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do estudo pelo método de microdiluição estão representados na Tabela 18.

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) pelo método de microdiluição contra bactérias e fungos apresentadas como concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) em mg.mL^{-1} .

Microrganismo	OELS		OECC		OECL	
	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM
<i>Streptococcus mutans</i>	1,45	2,07	2,94	5,60	148,40	169,60
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,33	3,54	2,10	2,52	42,40	42,40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,32	4,72	62,00	62,00	169,69	169,60
<i>Candida albicans</i>	1,16	3,54	0,46	0,98	8,48	8,48

*Realizado em triplicata

Os resultados dos ensaios de microdiluição demonstraram que o óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (OELS) se mostrou efetivo contra as bactérias e a *C. albicans*, sendo a menor CIM verificada frente a *C. albicans*. Os valores de CIM variaram de 1,16 à 4,32 mg.mL^{-1} . Embora tenha havido variação nas CIM e nas CBM entre microrganismos do ensaio, as CIM estavam próximas das CBM, indicando uma boa ação antibacteriana e antifúngica do OELS.

Estes resultados corroboram com os resultados de atividade antimicrobiana e antifúngica observados por Botelho et al. (2007a), com o óleo essencial das folhas de *L. sidoides* Cham. Neste estudo foi verificada a atividade do óleo de alecrim pimenta frente a quatro bactérias cariogênicas, incluindo o *S. mutans* e também frente a *C. albicans*. No método de difusão, foi verificado halo de inibição de 18,7 mm para *S. mutans* e 34mm para *C. albicans* com OELS na concentração de 217,5 mg.mL^{-1} e no ensaio de microdiluição a CIM e CBM para *S. mutans* encontradas foi de 5 e 20 mg.mL^{-1} , respectivamente e para *C. albicans*, a CIM foi de 2,5 mg.mL^{-1} e a CFM foi de 5 mg.mL^{-1} . Já Fontenelle et al. (2007) avaliaram o efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (teor de timol 59,65%) sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* através do método de microdiluição em caldo. A CIM e CFM para *C. albicans* foi 1250 mg.L^{-1} e 2500 mg.L^{-1} , respectivamente e no método de difusão, o halo de inibição máximo induzido pelo OELS foi de 23,3 mm $\pm$ 1,8 para *C. albicans* na maior concentração usada que foi de 100 mg.mL^{-1} .

O óleo essencial de capim limão (OECC) apresentou atividade frente a todos os microrganismos do estudo, sendo sua menor CIM obtida contra a *C. albicans* (0,46 mg.mL⁻¹). Já para *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a CIM encontrada foi 2,94, 2,10 e 62 mg.mL⁻¹ respectivamente. Perazzo et al. (2012), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre as bactérias formadoras do biofilme dentário (*S. mutans*, *S. salivarius* e *S. oralis*), sendo encontrado um melhor resultado frente a *S. mutans*, apresentando a CIM iguais a 0,5626 mg.mL⁻¹. Já para *S. salivarius* e *S. oralis*, os resultados mostraram atividade antimicrobiana semelhante de 2,25 mg.mL⁻¹.

O óleo essencial de limão siciliano (OECL), assim como os outros óleos essenciais do estudo, apresentou atividade frente a todos os microrganismos testados, no entanto, sua menor CIM obtida foi contra a *C. albicans* (8,48 mg.mL⁻¹), sendo uma concentração inibitória maior do que a verificada com o OELS e OECC. O mesmo se repetiu com os outros microrganismos. Para *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a CIM encontrada foi 148,40, 42,40 e 169,69 mg.mL⁻¹ respectivamente.

6.2.1.3 Método de Checkerboard

Os óleos essenciais foram testados em combinação, dois a dois (OELS x OECC, OELS x OECL e OECC x OECL) frente a cada microrganismo do estudo, sendo os resultados apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultado da atividade dos óleos essenciais associados pelo método de Checkerboard.

Microrganismo	OELS x OECC		OELS x OECL		OECC x OECL	
	ICIF	Tipo de efeito	ICIF	Tipo de efeito	ICIF	Tipo de efeito
<i>S. mutans</i>	1,25	Indiferente	> 4	Antagonismo	> 4	Antagonismo
<i>S. aureus</i>	2,00	Indiferente	IND	IND	IND	IND
<i>P. aeruginosa</i>	2,50	Indiferente	NR	NR	NR	NR
<i>C. albicans</i>	6,00	Antagonismo	> 4	Antagonismo	8,00	Antagonismo

ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. Se $ICIF \leq 0,5$ (sinergismo), $> 0,5$ e < 1 (aditivo) ≥ 1 e < 4 (indiferente), ≥ 4 (antagonismo) IND: Indeterminado; NR: Não realizado (LEWIS et al., 2002; BERDITSCH, et al., 2015).

Os resultados obtidos na microdiluição pelo método de *checkerboard* devem ser interpretados com cautela, pois na execução da metodologia foram verificadas limitações que podem comprometer a avaliação do resultado.

Uma das limitações observadas se refere ao óleo essencial de limão siciliano que se apresenta como uma emulsão de cor branca quando solubilizado em Tween 80 5% para preparação da solução mãe 0 (SM0). Em contato com a rezaurina para verificação da viabilidade dos microrganismos, o poço assume uma coloração diferente da esperada, dificultando a interpretação do resultado. Além disso, o OECL apresenta CIM mais alta que os outros óleos (OELS e OECC) para as bactérias do estudo, dificultando a obtenção das concentrações necessárias para avaliação do *checkerboard*. Neste caso não utilizamos a estratégia de aumentar a concentração do marcador (resazurina) para evitar resultados falso positivos. No estudo de Elshikh e colaboradores (2016) foi utilizado um método padronizado de microdiluição, incluindo corante resazurina para desenvolvimento de um método para medir a CIM de biosurfactantes, sendo validado através da replicação da determinação de CIM de tetraciclina e gentamicina com cepas bacterianas padrão. Este novo método permite a geração de medições precisas de CIM, enquanto supera questões críticas relacionadas à cor e solubilidade que podem interferir nas medições de crescimento para muitos tipos de extratos de biosurfactante.

Além disso, neste método, testamos apenas os óleos essenciais associados como princípios ativos, com concentrações baseadas na CIM de cada óleo, e não na concentração presente na formulação. Quando incorporados à forma farmacêutica, os óleos podem interagir de forma diferenciada entre eles e com os demais componentes devido ao meio em que se encontram. Isso pode ser observado na formulação da espuma dental desenvolvida (descrita no Capítulo V), pois quando os três óleos estão associados, é possível verificar que a atividade antimicrobiana pode ser afetada positivamente pela combinação, dependendo da concentração e do microrganismo. Esse fato pode ser devido aos outros componentes presentes na formulação que podem favorecer a solubilização dos óleos e torná-los mais disponíveis.

A incorporação de outros óleos essenciais além do OELS tem por finalidade mascarar o sabor e aroma forte e característico do alecrim pimenta. Essa estratégia pode favorecer a aceitabilidade do produto e adesão ao tratamento. Os óleos essenciais de capim limão e limão siciliano são comercialmente usados como mascarador de sabor e odor.

6.2.2 Citotoxicidade

6.2.2.1 Teste da membrana corioalantóide do ovo da galinha (HET-CAM)

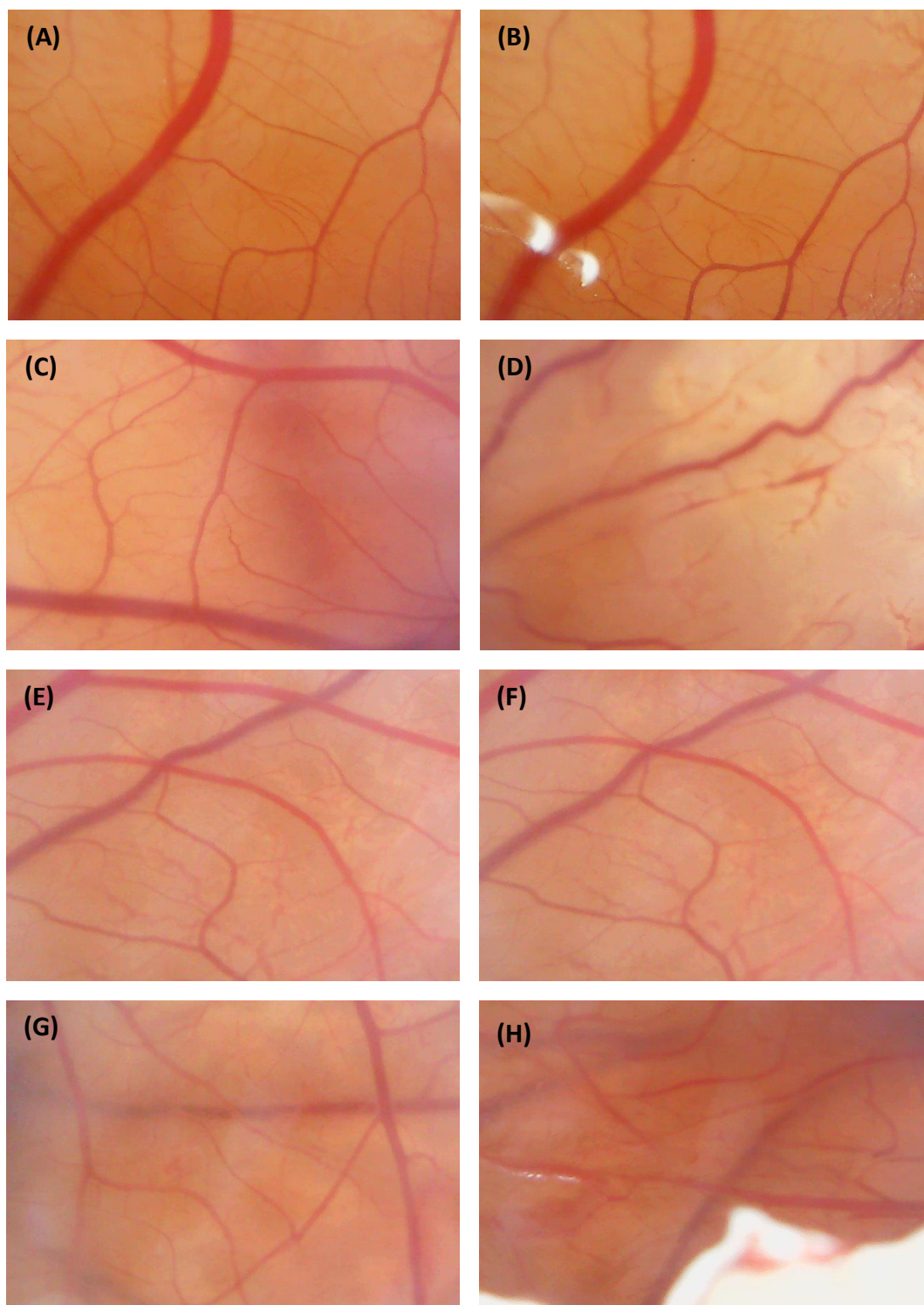
O ensaio foi realizado em um primeiro momento com o OELS nas concentrações de 2,5 e 1,4%, como um *screening* inicial para visualizar o comportamento do óleo essencial e posteriormente realizado com as concentrações que foram utilizadas no preparo da espuma dental, sendo analisados o OELS na concentração de 0,25 e 0,5%, OECC a 0,3% e OECL na concentração de 0,2%. Os resultados são apresentados na Tabela 20 e as imagens do teste podem ver visualizadas na Figura 27.

Tabela 20 - Resultados obtidos no HET-CAM para os óleos essenciais (OELS, OECC e OECL). Os efeitos de hemorragia, vasoconstrição e coagulação são apresentados em segundos e correspondem à média dos ovos analisados.

Amostras	Efeitos observados em 5 minutos *			Aplicação da fórmula
	Vasoconstrição	Hemorragia	Coagulação	Média $\pm$ desvio padrão
OELS 2,5%	NO	87,4	112,2	9,23 $\pm$ 0,46
OELS 1,4%	NO	116,1	129,0	8,25 $\pm$ 0,26
OELS 0,5%	94	138,8	NO	7,53 $\pm$ 0,33
OELS 0,25%	103,0	NO	NO	4,62 $\pm$ 0,30
OECC 0,3%	NO	NO	NO	0,00
OECL 0,2%	122	NO	NO	2,98 $\pm$ 0,1

*Média de 5 ovos. Não irritante: 0-0,9; levemente irritante: 1-4,9; irritante 5-8,9 e muito irritante: 9-21 (STEILING et al., 1999).

Figura 27 – Imagens obtidas no teste da membrana corialantóide do ovo da galinha (HET-CAM). (A) OELS 0,25% inicial, (B) OELS 0,25% final, (C) OELS 0,5% inicial, (D) OELS 0,5% final, (E) OECC 0,3% inicial, (F) OECC 0,3% final, (G) OECL 0,2% inicial e (H) OECL 0,2% final.



A partir dos resultados podemos verificar que o potencial de irritação apresentado pelo método do HET-CAM para o OELS reduziu conforme foi diminuída a concentração testada, passando de muito irritante ($9,23 \pm 0,46$) na concentração de 2,5% para levemente irritante ($4,62 \pm 0,30$) na concentração de 0,25%. O OECC 0,3% não apresentou sinais de hemorragia, vasoconstricção ou coagulação durante o tempo do ensaio, mostrando-se não irritante. Já o OECL 0,2% mostrou-se levemente irritante ($2,98 \pm 0,1$).

Este ensaio avalia os efeitos agudos sobre os pequenos vasos sanguíneos funcionais e proteínas da membrana corioalantóide, podendo ser usado como indicativo do potencial de irritação das substâncias em estudo, ressaltando que o ensaio foi realizado com os óleos essenciais isoladamente, podendo apresentar um comportamento diferente quando incorporado em uma forma farmacêutica ou associado a outros componentes na formulação.

6.2.2.2 Teste de hemólise

O teste de hemólise foi realizado como um *screening* inicial para verificação da toxicidade. Foram testadas hemácias provenientes de sangue tipos O⁺, A⁺ e B⁺, pois os tipos sanguíneos diferem em relação aos açúcares de superfície que os eritrócitos possuem o que poderia gerar resultados diferenciados, sendo o grupo O o que apresenta menor quantidade de açúcares, tornando-o mais sensível. Além disso, a interação com os óleos essenciais do estudo pode ocorrer de forma diferenciada em cada grupo sanguíneo.

Assim, no nosso estudo, os resultados devem ser interpretados com cautela, por se apresentar como uma medida indireta de toxicidade, devendo levar em consideração também que o produto obtido a partir dos óleos essenciais será utilizado na cavidade bucal, sendo de aplicação tópica e expectorado após a aplicação e o contato seria com o sangue proveniente das lesões bucais.

Os resultados dos testes de hemólise dos óleos essenciais do estudo são apresentados na Tabela 21 e na Figura 28. Os resultados foram expressos em porcentagem do grau de hemólise, sendo considerado elevado quando acima de 15%. O controle negativo utilizado foi a solução salina que corresponde a 0% de hemólise e como controle

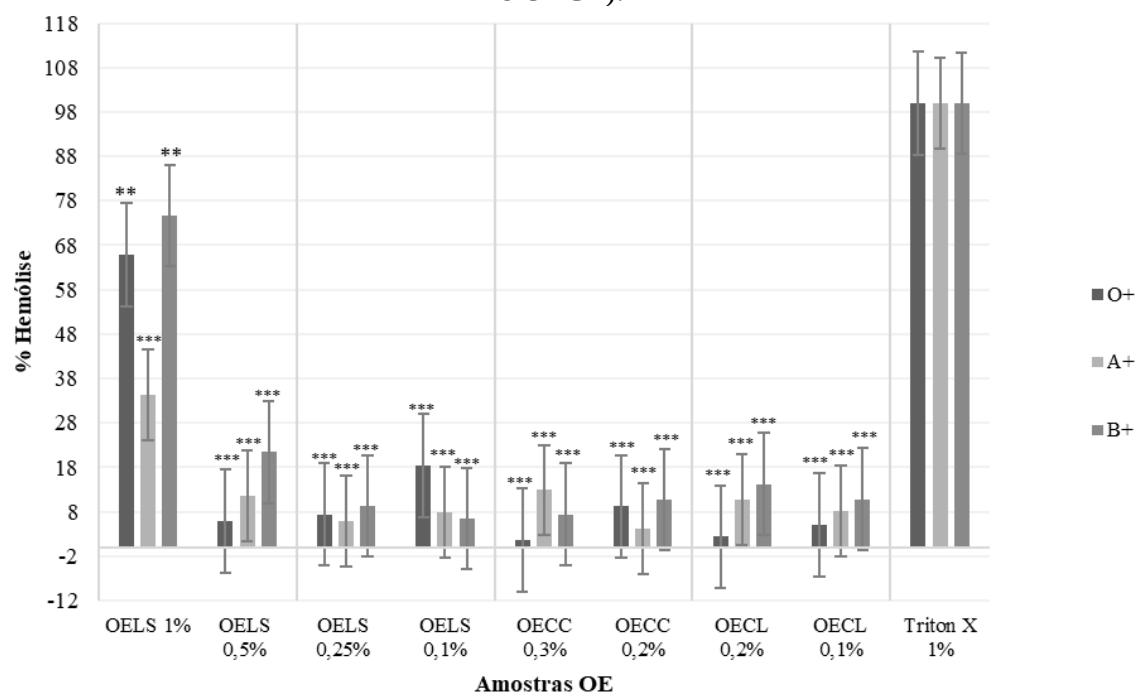
positivo foi usado o Triton-X-100 a 1% que corresponde a 100% de hemólise. Para o OELS 0,1 e 1%, o valor de absorbância pra o controle positivo foi 0,592. Para os outros óleos analisados foi de 0,824, 0,726 e 0,731 para os tipos sanguíneos O⁺, A⁺ e B⁺ respectivamente. A análise comparativa entre os grupos e os controles foi realizada, usando test *t* no programa estatístico SPSS versão 17.

Tabela 21 - Resultado do teste de hemólise dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL).

% Hemólise *			
Amostras	O ⁺	A ⁺	B ⁺
OELS 0,1%	18,33	7,94	6,48
OELS 0,25%	7,44	5,97	9,37
OELS 0,5%	5,95	11,52	21,41
OELS 1%	65,79	34,46	74,72
OECC 0,2%	9,22	4,13	10,81
OECC 0,3%	1,64	12,88	7,46
OECL 0,1%	5,14	8,26	10,85
OECL 0,2%	2,37	10,81	14,30

*Média de três repetições.

Figura 28 - Resultado em porcentagem de hemólise dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL).



Análise comparativa dos grupos pelo test *t*, utilizando o programa estatístico SPSS versão 17. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle Triton X 1%.

A partir dos resultados apresentados, pode-se verificar que o OELS na concentração mais elevada (1%) apresentou alta porcentagem de hemólise para os três tipos sanguíneos. Já o OELS 0,5%, apresentou hemólise superior a 15% para hemácias do tipo B⁺ enquanto na concentração de 0,1% apresentou 18,33% de hemólise para o tipo sanguíneo O⁺. As demais amostras de OELS, assim como as amostras de OECC e OECL demonstraram baixa toxicidade contra os eritrócitos, mostrando reduzida capacidade em danificar a membrana citoplasmática dos eritrócitos e consequentemente causar a ruptura de células dos três grupos sanguíneos. Foram realizados testes de comparação pareados com o controle positivo (TRITON X 1%) e controle negativo (NaCl) em relação ao percentual de hemólise para os três tipos sanguíneos O⁺, A⁺ e B⁺. Considerando um nível de significância de 5%, verificamos que há diferenças significativas entre o percentual de hemólise com o controle positivo ao nível especificado para os três grupos sanguíneos (p-valor < 0,05), exceto OELS 1% para sangue O⁺ (p-valor = 0,05) e OELS 1% para sangue B⁺ (p-valor = 0,05). Em relação ao controle negativo, OECC 0,3% (p-valor = 0,182) e OECL 0,2% (p-valor = 0,241) para sangue O⁺ e OECC 0,2% (p-valor = 0,079) para sangue A⁺ não apresentaram diferenças significativas.

6.2.2.3 Bioensaio com *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* foi realizado com o intuito de fazer um *screening* inicial para avaliar a toxicidade do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. O óleo essencial mostrou ação tóxica frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, sendo possível observar alta taxa de mortalidade do microcrustáceo, quando submetido a concentrações de OELS de 15,625 à 1000 µg.mL⁻¹ e causando 100% de mortalidade a partir de 31,25 µg.mL⁻¹.

De acordo com o estudo realizado por Meyer e colaboradores (1982), as substâncias são consideradas tóxicas quando apresentam valores de DL₅₀ abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina*. Este teste de toxicidade tem como objetivo avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES; FORBES, 1994).

Em um estudo realizado por Fabri e colaboradores (2011), a toxicidade do extrato metanólico das folhas de *L. sidoides* Cham. foi testada frente a larvas de *Artemia salina*,

sendo observado valores de $CL_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato e $1,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o timol na forma isolada (FABRI et al., 2011). Esse resultado apresentado está relacionado ao que foi obtido em nosso estudo, uma vez que o timol é o componente majoritário do OELS, correspondendo aproximadamente a 70% dos constituintes do óleo essencial e apresenta alta toxicidade para a *Artemia salina*. Neste contexto, mais estudos são necessários com a finalidade de se obter dados de toxicidade para garantir a segurança do óleo essencial para o uso em produtos para saúde.

6.3 Conclusão

Em nosso estudo, os resultados obtidos com os óleos essenciais de *L. sidoides* Cham., *C. citratus* e *C. limon*, demonstraram a atividade antimicrobiana dos três óleos frente a todos os microrganismos testados (*S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*). O OELS apresentou menor CIM contra a *S. mutans*, importante bactéria cariogênica enquanto os OECC e OECL apresentaram menores CIM contra o fungo *C. albicans*. Quando avaliada a atividade antimicrobiana com os óleos em associação através do método de *checkerboard* não foi evidenciado sinergismo entre eles, no entanto, na espuma dental podemos observar que a atividade antimicrobiana pode ser influenciada por essa combinação. Por esse motivo, os resultados devem ser interpretados com cautela. Em relação à citotoxicidade, a partir do HET-CAM, podemos verificar que o óleo de *L. sidoides* Cham. se torna menos irritante com o decréscimo da concentração utilizada, enquanto o óleo de *C. limon* é considerado levemente irritante e o óleo de *C. citratus* mostrou-se não irritante. No teste de hemólise, verificamos diferenças em relação aos grupos sanguíneos na porcentagem de hemólise. O OELS apresentou alto grau de hemólise na maior concentração testada (1%) e acima de 15% apenas nas concentrações 0,5% para o tipo B⁺ e 0,1% para o tipo O⁺. As demais amostras de OELS, assim como as amostras de OECC e OECL demonstraram baixa toxicidade contra os eritrócitos, ocasionando porcentagem de hemólise abaixo de 15%. No bioensaio com a *Artemia salina*, o OELS apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo em todas as concentrações testadas.

CAPÍTULO V

7. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESPUMA DENTAL (ED) CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS

7.1 Materiais e Métodos

Para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da espuma dental foi realizado a técnica de difusão em ágar por poços. Foram utilizados os mesmos microrganismos e seguido os mesmos procedimentos para preparação do inóculo realizado para o ensaio com os óleos essenciais do estudo, descritos no capítulo IV. Os ensaios foram realizados no LABIAL, utilizando capela de fluxo laminar e materiais previamente autoclavados.

7.1.1 Materiais

Solução salina 0,9% obtida a partir de NaCl (Sigma[®]), BHI caldo e BHI ágar (Brain Heart Infusion, Kasvi[®] Brasil) Sabouraud caldo, Sabouraud ágar (Kasvi[®] Brasil), solução de clorexidina 0,12% (Sigma[®]), Tween[®] 80 5% (Sigma[®]), resazurina 0,01% (Sigma[®]), espumas dental contendo OELS, OECC e OECL, fornecidas pela CLI Indústria de Cosméticos Ltda.

7.1.2 Preparação da espuma e incorporação dos óleos essenciais

Em colaboração com as empresas Oralls[®] e CLI Indústria de Cosméticos Ltda, uma espuma dental, contendo óleos essenciais foi desenvolvida. Trata-se de uma preparação líquida que quando disponibilizada através de uma bomba espumadora, permite a liberação da espuma. Os excipientes da formulação incluem: água, adoçante natural, conservante, umectante, emulsificante e tensoativos. O xilitol foi utilizado em todas as formulações na concentração de 5%.

O xilitol se apresenta como um pó cristalino branco, é um poliálcool com fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano), derivado do açúcar originado de plantas, frutas e vegetais, que apresenta propriedades antimicrobianas descritas na literatura. Devido ao sabor adocicado o xilitol tem sido utilizado como edulcorante em produtos farmacêuticos e alimentícios (ALMEIDA, 2006; PEREIRA, 2009) e como

adoçante em goma de mascar (WANG; VAN-EYS, 1981). O nome xilitol relaciona-se à xilose, o açúcar da madeira, a partir da qual o xilitol foi obtido pela primeira vez. Na nomenclatura química, o xilitol é classificado de maneira similar ao sorbitol e ao manitol, ou seja, como um açúcar-álcool ou um poliol (ALMEIDA, 2006; PEREIRA, 2009; WANG; VAN-EYS, 1981). O xilitol também é estudado pela sua capacidade em reduzir o crescimento e a produção de ácidos do *Streptococcus mutans*, principal bactéria responsável pelo desenvolvimento da cárie dentária (PEREIRA, 2009; MILGROM *et al.*, 2009; MUSSATO; ROBERTO, 2002; ALMEIDA, 2006).

A ação antibacteriana do xilitol ocorre devido à interrupção do ciclo glicolítico da bactéria, parando a produção de ATP e assim, inibindo o crescimento do patógeno. O xilitol também é capaz de reduzir a aderência dos *Streptococcus mutans* ao biofilme do dente (USA, 2011; PEREIRA, 2009; LIMA *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2001).

A concentração ideal de xilitol para eficácia anti-cárie varia de 6 a 10%, de acordo com alguns estudos, sendo valores bem maiores do que quando utilizado como edulcorante. (PEREIRA, 2009; LIMA *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais foram incorporados ao líquido espuma, originando os produtos relacionados no Quadro 2.

Quadro 2 - Produtos obtidos a partir da incorporação dos óleos essenciais (OELS, OECC e OECL) ao líquido espuma.

Formulações	Ativos
Espuma OELS 0,1%	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. 0,1%
Espuma OELS 0,25% + OECC + OECL	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. 0,25% + óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> 0,2% + óleo essencial de <i>Citrus limon</i> 0,2%
Espuma OELS 0,5% + OECC + OECL	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. 0,5% + óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> 0,3% + óleo essencial de <i>Citrus limon</i> 0,1%
Espuma OELS 0,5%	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. 0,5%
Espuma OELS 1%	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. 1%
Espuma placebo	Excipientes sem óleos essenciais

7.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana da espuma dental

7.1.3.1 Ensaio de difusão em ágar

Para os testes de difusão em ágar foi vertido cerca de 15 mL de BHI ágar em placas de petri. Após a solidificação do meio, o inóculo foi colocado na placa por imersão, produzindo uma camada uniforme de inóculo (previamente padronizado) em toda superfície do meio. Poços foram feitos com o auxílio de uma ponteira estéril no meio plaqueado para testar os produtos desenvolvidos. Em cada poço foi colocado 50 µL de cada produto a ser testado. Como controle positivo foram utilizados solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo o Tween® 80 5% ou a solução salina 0,9% estéril. As medidas dos halos de inibição (mm) foram realizadas após 24h (*S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e 48h (*C. albicans*) (BAUER *et.al.*, 1966). Todos os testes foram realizados em triplicata.

7.2 Resultados e Discussão

7.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da espuma dental

7.2.1.1 Ensaio de difusão em ágar

Pelo método de difusão em poços, foram testadas a espuma dental (ED) obtida a partir dos óleos essenciais (ED 0,1%; ED 0,25% + associações; ED 0,5%; ED 0,5% + associações e ED 1%) e a espuma dental placebo, sendo usado como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo o Tween® 80 5% ou solução salina 0,9% estéril. Os resultados são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Atividade antimicrobiana das espumas dental (ED) pelo método de difusão em ágar. A clorexidina (CLX) 0,12% usada como controle positivo e o Tween® 80 5% como controle negativo.

Amostra	Medida do halo de inibição (mm)*			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
ED 0,1%	13,8	17,0	16,1	18,4
ED 0,25% + Assoc.	11,3	16,6	15,3	19,6
ED 0,5%	11,9	15,7	20,4	21,3
ED 0,5% + Assoc.	14,4	17,2	18,4	22,0
ED 1%	13,0	18,7	>21,0	23,7
ED placebo	10,5	14,5	13,5	13,0
CLX 0,12%	18,0	15,5	13,0	15,0
Tween® 80 5%	0,0	0,0	0,0	0,0

*Média de cinco repetições.

Todas as apresentações de espuma dental mostraram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos do estudo pelo método de difusão em poços. Para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, os produtos desenvolvidos apresentaram halos de inibição maiores que os encontrados com o controle positivo (CLX 0,12%), demonstrando importante efetividade. A espuma placebo também apresentou halo de inibição frente aos

microrganismos testados, porém com valores de halos inferiores aos apresentados nas formulações contendo os óleos essenciais e o controle positivo.

Foram testados também, alguns excipientes que compõem a formulação da espuma dental. O xilitol foi testado a partir de soluções preparadas com água deionizada estéril nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10 e 20%, sendo avaliada a atividade antimicrobiana frente a *S. mutans*. Não foram visualizados halos de inibição em nenhuma das concentrações de xilitol testadas. O xilitol presente na formulação, por ser um álcool açúcar, pode favorecer a solubilidade dos óleos essenciais e simultaneamente atua como conservante devido à elevada estabilidade química. Em adição, devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos na estrutura química, o xilitol não participa de reações com aminoácidos (Ex.: como reações de “Maillard”). Essas propriedades tornam o xilitol um edulcorante versátil e que ainda tem as propriedades de realçar os sabores dos alimentos e gomas de mascar (MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Ainda foram testados outros excipientes, pelo método de difusão em poços, sendo um tensoativo, um surfactante não-iônico e um emulsificante, na forma pura, sem diluições e um adoçante natural na concentração de 5 mg.mL⁻¹. Os excipientes a serem testados foram escolhidos por estarem em maior concentração na formulação. Os resultados obtidos revelam que em alta concentração esses componentes apresentam atividade antimicrobiana, apresentando halos de inibição de 13,8 à 25,8 mm para *S. mutans*, 20 à 25,5 mm para *S. aureus*, 15,3 à 20,5 mm para *P. aeruginosa* e 13,3 à 24,8 mm para *C. albicans*. O adoçante natural não apresentou atividade para nenhum microrganismo estudado e o emulsificante não formou halo de inibição apenas para *C. albicans*. Foi usado como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo a solução salina 0,9% estéril.

A espuma dental devido à sua formulação aerada se apresenta como uma preparação leve que favorece sua aplicação na cavidade bucal, permitindo uma melhor adesão ao tratamento em pacientes que possuem lesões ulcerativas, uma vez que a higienização de rotina ou utilização de produtos terapêuticos na cavidade bucal podem provocar sintomatologia dolorosa.

O intuito de se associar outros óleos ao OELS partiu da premissa de mascarar o sabor e aroma característico do alecrim pimenta que é bastante forte e adstringente,

favorecendo a aceitabilidade do produto e adesão ao tratamento. O limão siciliano apresenta sabor e aroma agradáveis, característico dos frutos cítricos e o capim limão apresenta sabor picante e aroma agradável, conferindo à formulação refrescância, sendo muito utilizados comercialmente como mascarador de sabor.

Um estudo realizado paralelamente por pesquisadores do grupo LABIAL, avaliaram a aceitação da espuma dental desenvolvida a partir de um questionário sobre as características organolépticas e modo de aplicação do produto, sendo avaliadas a aparência, consistência, aplicação, sabor e odor do produto, se ele causa aumento de salivação, ardência, dor, dormência, refrescância, náusea ou outras alterações durante ou após o uso. Além disso foi verificado também as características citomorfológicas através do esfregaço da mucosa e contagem de microrganismos na saliva antes e após a aplicação do produto. Neste estudo, a espuma dental apresentou uma boa aceitação em relação a aparência e consistência para 100% dos pacientes e a espuma na concentração de 0,5% de OELS associada aos outros óleos essenciais apresentou redução estatisticamente significativa de bactérias após uma única aplicação do produto por 01 minuto (SILVEIRA, 2018).

Os estudos clínicos de fase I e fase II envolvendo o óleo essencial de *L. sidoides* Cham. encontrados na literatura compreendem ensaios aplicados à Odontologia (BRASIL, 2018). Nenhum dos estudos utiliza a formulação em espuma ou apresenta associação do OELS com outros óleos essenciais.

Em um estudo randomizado envolvendo o uso de um colutório contendo extrato de *L. sidoides*, foi relatado que 94% dos pacientes apresentaram remissão completa ou parcial da mucosite oral com a utilização do colutório e que apenas em 6% dos pacientes tratados não houve alteração do quadro clínico (ALBUQUERQUE, 2010).

Em outro estudo, foi realizado um ensaio randomizado, sendo coletada a saliva dos participantes antes e após a aplicação do tratamento com o uso tópico de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial das folhas de *L. sidoides* nas concentrações de 0,6%, 0,8%, 1% e 1,2%. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas, mas foi verificado que a concentração de 0,8% apresentou maior redução do crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus mutans* (LOBO

et al., 2011). Foi avaliado também o uso de gel contendo óleo essencial das folhas nas concentrações de 0,8%, 1%, 1,2% e 1,4%, sendo a saliva coletada antes e após a aplicação do tratamento para contagem bacteriana. Os resultados mostraram que na forma de gel, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas, no entanto, a concentração de 1,4% mostrou maior redução do crescimento de *Streptococcus mutans*. Em relação aos constituintes isolados, timol e carvacrol, foi avaliada a atividade na redução da carga bacteriana com enxaguatório bucal contendo a mistura das duas substâncias, não resultando diferença entre o enxaguatório à base de óleo essencial 0,8% e o enxaguatório que continha os constituintes timol e carvacrol. O mesmo foi observado quando comparado o gel contendo o óleo não sendo verificada diferença entre o gel contendo 1,4% de OE e o gel composto da mistura timol-carvacrol (LOBO et al., 2011).

Foi avaliado o uso de um enxaguatório bucal com 1% de OE das folhas em pacientes de 17 a 63 anos de idade, que apresentavam índice de placa gengival mínimo de 1,2 e possuindo 10 ou mais dentes. Foi realizado o tratamento com bochecho, usando 15 mL do enxaguatório, por 30 segundos, duas vezes ao dia, durante sete dias. O grupo tratado com o enxaguatório à base de OE apresentou diminuição do índice de placa gengival e do sangramento gengival semelhante ao controle positivo de clorexidina 0,12% (BOTELHO et al., 2007b). Outro estudo também avaliou um enxaguatório bucal contendo 1% de OE seguindo o mesmo protocolo de utilização descritos anteriormente, e duração do tratamento de 30 dias. O ensaio foi randomizado, controlado, duplo-cego, e incluíram pacientes de 18 a 69 anos, com índice gengival mínimo de 1,05 que possuíam dez ou mais dentes. O uso do enxaguatório reduziu em mais de 58% a contagem de *S. mutans*, de forma similar ao controle positivo de clorexidina 0,12%. Também foi verificado a redução dos índices de placa gengival e de sangramento gengival no 7º e no 30º dia após o início do tratamento em relação às medidas basais. Foi relatado leve sensação de queimação nos grupos teste e controle (BOTELHO et al., 2009).

Os resultados obtidos com a espuma dental desenvolvida com o OELS sugerem uma importante alternativa para uma terapêutica eficaz e de baixo custo para pacientes com lesões ulcerativas na cavidade oral, incluindo a mucosite oral e a estomatite aftosa recorrente.

7.3 Conclusão

A espuma dental desenvolvida a partir dos óleos essenciais de *L. sidoides* Cham., *C. citratus* e *C. limon*, apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos do estudo em todas as concentrações e associações testadas. Estes resultados de atividade antimicrobiana quando avaliados juntamente com os testes de citotoxicidade realizados com os óleos essenciais isoladamente, nos direcionam para uma formulação eficaz e segura. Sendo assim, a apresentação de espuma dental contendo OELS na concentração de 0,5% (ED 0,5%) se apresenta como alternativa promissora para o manejo terapêutico das lesões ulcerativas da mucosa bucal. Essa formulação desenvolvida e avaliada neste estudo foi patenteada e está registrada sob o número de processo BR 10 2018 016386 8, datada de 10/08/2018 (Anexo I).

CAPÍTULO VI

8. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM MATRIZ SÓLIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DO TIMOL

8.1 Materiais e Métodos

8.1.1 Materiais

As micropartículas usadas foram obtidas experimentalmente, o n-hexano 95% grau HPLC adquirido da TEDIA[®], o lauril sulfato de sódio e a maltodextrina foram fornecidos pela Farmácia de manipulação Dilecta[®], a carboximetilcelulose pela Farmácia de manipulação ArtFarma[®] e a hidroxipropilmetilcelulose pela Farmácia de manipulação Teixeira[®].

8.1.2 Desenvolvimento do método de extração em matriz sólida

O método de extração foi desenvolvido no intuito de liberar o ativo que está preso na matriz polimérica da micropartícula, com o objetivo de quantificá-lo e expressar a sua recuperação em cada uma das preparações.

No desenvolvimento do método o processo de extração foi dividido em 3 etapas, sendo a primeira etapa realizada com os excipientes em contato com a solução padrão de timol (9,65 mg.mL⁻¹), solubilizado em água. Na segunda etapa, estavam presentes a solução padrão e a solução de OELS (solução contaminada) e na terceira etapa a extração envolvia o OE já microencapsulado. Na primeira e na segunda etapas foram testados três níveis de concentração: baixa, média e alta e a recuperação calculada.

8.1.3 Validação de metodologia analítica

Após o desenvolvimento do método mais adequado para extração do timol em matriz sólida, este foi validado de acordo com o que preconiza a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção e robustez (BRASIL, 2003). Na segunda etapa, em que o padrão é adicionado à

solução de óleo essencial, utilizou-se as condições de extração que foram estabelecidas após a validação da primeira etapa, sendo posteriormente validada também.

8.1.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da análise dos perfis cromatográficos após o processo de extração da matriz da solução padrão de timol, da solução contendo o óleo essencial com adição do padrão (solução contaminada), do n-hexano (branco), e da extração realizada apenas com os excipientes. Para que o método seja seletivo a resposta analítica deve ser exclusivamente referente ao analito sem interferências dos excipientes usados no processo de obtenção da micropartícula. A seletividade e a linearidade são comuns para a etapa apenas com o padrão e para a solução contaminada.

8.1.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir da construção de três curvas de calibração com o padrão timol, a qual contemplou sete concentrações distintas: 0,0965, 0,1930, 0,2895, 0,3860, 0,4825, 0,5790 e 0,6755 mg.mL⁻¹. A partir das três curvas, foi obtida a linearidade média com a finalidade de avaliar a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. Os valores foram analisados através da regressão linear e do coeficiente de correlação.

8.1.3.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente a partir dos dados da curva de calibração obtida na linearidade média. O limite de detecção (LD) foi determinado a uma relação sinal-ruído (S/N) de 3,0 e o limite de quantificação (LQ) foi determinado a razão de S/N de 10, sendo calculado conforme equações a seguir:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

8.1.3.4 Precisão

Na primeira etapa, o ensaio da precisão foi avaliado em três níveis de concentração da solução de padrão timol: baixa, média e alta com teor de 50% ($0,1255 \text{ mg.mL}^{-1}$), 100% ($0,2610 \text{ mg.mL}^{-1}$) e 150% ($0,3860 \text{ mg.mL}^{-1}$) respectivamente. Na segunda etapa, o ensaio da precisão foi avaliado em três níveis de concentração da solução de padrão timol adicionada à solução de óleo essencial, utilizando 125 μL (baixa), 250 μL (média) e 375 μL (alta) em relação à solução padrão de timol e a solução de óleo essencial, na concentração de $9,650 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $9,432 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente, resultando na concentração teórica de $0,2260 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,4401 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,6432 \text{ mg.mL}^{-1}$ na solução contaminada. Foram feitas seis determinações, correspondendo à repetibilidade (intra-dia), e repetida esta análise em um segundo dia, para determinar a precisão intermediária (inter-dia). A precisão foi verificada pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%), sendo considerado preciso quando apresentou DPR menor ou igual a 5 %, de acordo com a legislação vigente.

8.1.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi estabelecida, utilizando três níveis de concentração: baixa, média e alta, contendo 125 μL , 250 μL e 375 μL da solução padrão de timol ($9,650 \text{ mg.mL}^{-1}$). Seguindo o mesmo procedimento, foram realizadas análises da solução de padrão timol adicionada à solução de óleo essencial, em três níveis de concentração: baixa, média e alta, contendo 125 μL , 250 μL e 375 μL de cada uma das soluções. Foram feitas 6 determinações em cada nível de concentração. A exatidão foi obtida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo expressa em percentagem de acordo com a equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

8.1.3.6 Robustez

A robustez foi analisada a partir de modificações intencionais nas condições do método de extração desenvolvido, com alterações no volume de água utilizado, no tempo de agitação no vórtex e no tempo de centrifugação. A condição normal do método de extração corresponde à 3 mL de água, 5 minutos de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação. Para a segunda etapa com a solução contaminada, utilizou-se os mesmos parâmetros para avaliação da robustez, porém as condições normais do método foram ajustadas de acordo com os resultados obtidos nos testes de robustez, utilizando apenas a solução padrão de timol, sendo considerado como condição normal 1,5 mL de água, 5 minutos de agitação em vórtex e 7,5 minutos de centrifugação.

O método foi considerado robusto se o desvio do valor nominal estivesse dentro de 5,0%.

8.2 Resultados e Discussão

8.2.1 Desenvolvimento do método de extração em matriz sólida

Para o processo de extração, 100 mg do excipiente foi colocado em um tubo de vidro com tampa rosqueada e adicionado 3 mL de água seguido da adição de 250 µL da solução padrão de timol. Essa mistura foi então levada para um agitador do tipo vórtex por 5 minutos e acrescentado 3 mL de hexano e mais uma vez agitada em vórtex por 5 minutos. Após essa etapa foi formada uma mistura com duas fases, sendo centrifugadas por 10 minutos em 3000 rpm para separação completa da fase orgânica (hexano) e aquosa. Após a visível separação, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foi retirada toda a fase orgânica e colocada em outro tubo. Para garantir que todo o timol havia sido extraído pelo hexano, esse processo foi realizado 3 vezes. Do tubo contendo a fase hexânica das três extrações, foi retirada uma amostra que foi colocada em um vial âmbar para leitura no CG-DIC, usando a metodologia anteriormente validada para determinação do timol no OELS. Na segunda etapa, seguiu-se o mesmo procedimento descrito, porém foi adicionado também 250 µL da solução de OELS.

Com o intuito de avaliar se a recuperação sofria influência do volume de água utilizado no processo, do tempo de agitação em vórtex e do tempo de centrifugação, estes parâmetros foram variados, seguindo as combinações apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23 - Combinações de parâmetros para avaliação da recuperação.

Tentativas	Volume de água (mL)	Vórtex (min)	Centrifugação (min)
Método proposto	3	5	10
A	1,5	5	10
B	4,5	5	10
C	3	5	5
D	3	5	7,5
E	3	5	10
F	3	2,5	10
G	3	7,5	10

Em relação ao método proposto, o volume de água foi reduzido para 1,5 mL e aumentado para 4,5 mL. Já o tempo de agitação foi reduzido para 2,5 minutos e aumentado para 7,5 minutos, enquanto o tempo de centrifugação foi reduzido para 2,5 minutos e aumentado para 7,5 minutos. Apenas um parâmetro foi modificado por vez para avaliar o efeito que exercia sobre a recuperação.

Após o processo de extração, a fase hexânica de cada uma das combinações foram analisadas no CG-DIC para verificação da recuperação do timol, usando a metodologia de quantificação anteriormente validada. A partir dos resultados encontrados de percentual de recuperação foi realizada análise estatística dos dados e os parâmetros do método de extração foi definido.

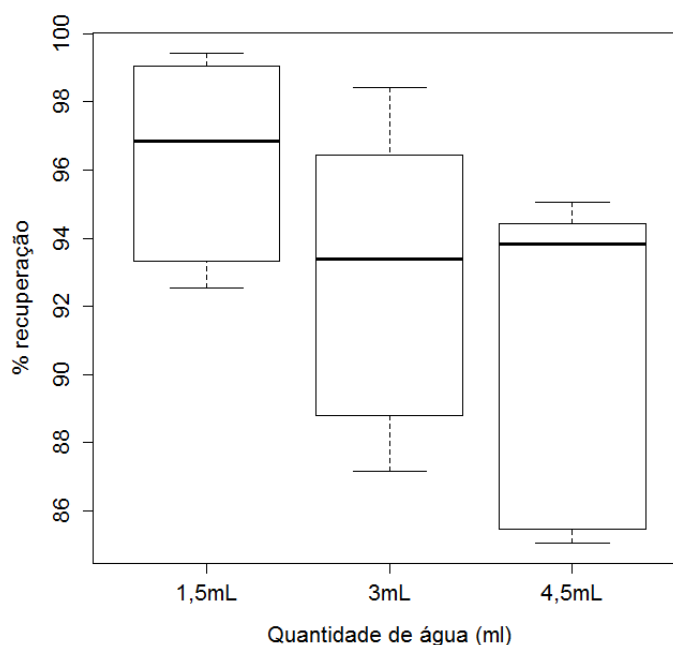
Na Tabela 24 são apresentadas algumas estatísticas descritivas da variável percentual de recuperação para os níveis de água. Nota-se, por exemplo, que o percentual de recuperação considerando 1,5 mL de água apresentou média de 96,34 com desvio padrão de 2,86, apresentado média superior e desvio padrão inferior quando considerados os níveis 3 mL e 4,5 mL. Além disso, analisando as medidas de posição e dispersão, observa-se que o percentual de recuperação é similar para os níveis 3 mL e 4,5 mL.

Tabela 24 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes níveis de água.

Estatística	Quantidade de água		
	1,5 mL	3 mL	4,5 mL
Média	96,34	92,85	91,28
Mediana	96,84	93,38	93,82
Mínimo	92,53	87,17	85,05
Máximo	99,44	98,43	95,07
Desvio padrão	2,86	4,36	4,69
Variância	8,2	19,01	21,95

Para avaliar o efeito do nível de água no percentual de recuperação, foi realizado um teste de hipóteses baseado na análise de variância. Com base no teste F, verificou-se ao nível de significância de 5% que não há indícios para rejeitar a hipótese de que os níveis de água utilizados possuem efeitos diferentes no percentual de recuperação ($p\text{-valor} = 0,118$). No entanto, para validar os resultados da análise de variância foram aplicados os testes de normalidade de Lilliefors ($p\text{-valor} = 0,0306$) e Shariro-Wilks ($p\text{-valor} = 0,0316$), sendo a hipótese de normalidade dos dados rejeitada aos níveis usuais de significância. Esse fato, deve-se principalmente, ao pequeno tamanho amostral $n = 6$. Além disso, realizamos o teste de homogeneidade de variâncias, sendo o $p\text{-valor} = 0,5799$, não rejeitando a hipótese de homogeneidade de variâncias. Dessa forma, torna-se necessário recorrer a métodos não paramétricos, uma vez que os dados não seguem uma distribuição normal e o tamanho amostral é pequeno. Alternativamente à ANOVA, aplicamos a contrapartida não paramétrica de Kruskal-Wallis. Considerando o nível nominal de 5%, temos que novamente não há evidência para rejeitar a hipótese de os efeitos dos diferentes níveis de água utilizados são os mesmos no percentual de recuperação ($p\text{-valor} = 0,1518 > 0,05$). Apesar de não haver diferenças significativas estatisticamente, observa-se que o nível 1,5 mL apresentou resultados levemente superior aos demais, o que pode ser visto de forma mais clara a partir do boxplot na Figura 29.

Figura 29 - Percentual de recuperação para os diferentes níveis de água.



Na Tabela 25, apresentamos os resultados para o percentual de recuperação considerando diferentes tempos de agitação em vórtex. Nota-se, que o tempo de vórtex 7,5 minutos produziu o maior percentual médio de recuperação quando comparado aos tempos 2,5 e 5 minutos, cujo valor foi 95,22 com desvio padrão 3,19. Já os tempos 2,5 e 5 minutos apresentaram resultados similares, com percentual médio de recuperação de 93,27 e 93,43, respectivamente.

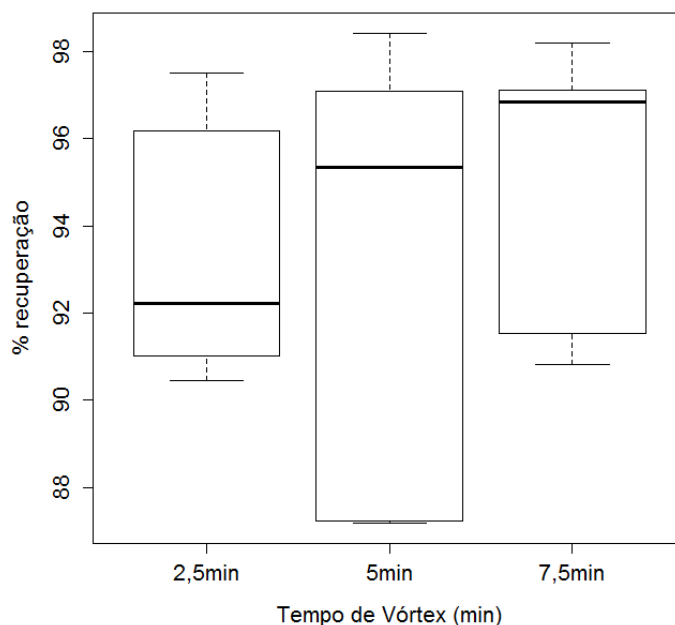
Para avaliar diferenças significativas entre os diferentes tempos de vórtex no percentual de recuperação, realizamos um teste de hipóteses baseado na ANOVA. Considerando o nível de significância de 5%, podemos concluir que há diferenças significativas entre os diferentes tempos de vórtex ($p\text{-valor} = 0,623$). Como no caso anterior, aplicamos os testes de normalidade para validar os resultados da análise de variância. Os p -valores dos testes de Shapiro-Wilks e Lilliefors foram 0,1713 e 0,0261, respectivamente, de modo que os testes produziram resultados contrários quanto a essa suposição. Além disso, aplicamos o teste de homogeneidade de variâncias, cujo p -valor foi 0,393, evidenciando de que essa hipótese não é rejeitada aos níveis de significância usuais. Uma vez que os testes são bastante sensíveis ao tamanho amostral, apresentando distorções em pequenas amostras, decidimos realizar novamente o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, cujo p -valor do teste foi 0,63. O resultado do teste indica que não há

diferenças significativas entre os tempos de vórtex aos níveis de significância usuais. Complementarmente, apresentamos na Figura 30 os boxplots da variável percentual de recuperação para os diferentes tempos de vórtex. Com base na análise gráfica, verifica-se que o tempo 7,5 minutos apresentou desempenho levemente superior aos demais tempos. Nota-se ainda, que a dispersão verificada nesse tempo é inferior a dispersão para o tempo 5 minutos e levemente superior à do tempo 2,5 minutos.

Tabela 25 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes tempos de vórtex.

Estatística	Tempo de vórtex		
	2,5 min	5 min	7,5 min
Média	93,27	93,43	95,22
Mediana	92,23	95,34	96,85
Mínimo	90,44	87,17	90,82
Máximo	97,51	98,43	98,19
Desvio padrão	2,9	4,98	3,19
Variância	8,4	24,78	10,16

Figura 30 - Percentual de recuperação para os diferentes tempos de vórtex.



Na Tabela 26, apresentamos os resultados do percentual de recuperação inerentes aos tempos de centrífuga. Nota-se, que para o tempo de centrífuga 7,5 minutos, o

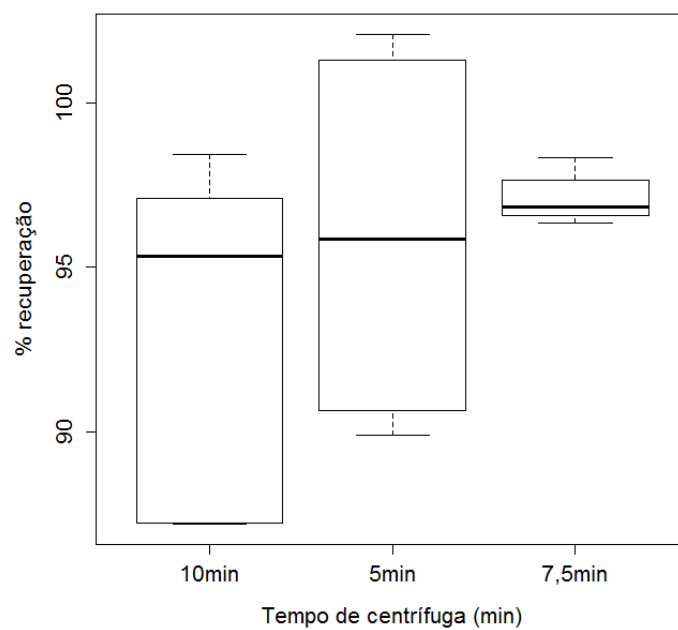
percentual médio de recuperação foi de 97,09 com um desvio padrão de 0,76, resultados superiores aos demais tempos considerados. Além disso, nota-se que os resultados para os tempos 5 e 10 minutos apresentam resultados similares, sendo os do primeiro levemente superior.

Para verificar de forma precisa diferenças entre os tempos de centrífuga analisados, no percentual de recuperação, realizamos uma análise de variância, considerando um nível de significância de 5%. Com base no resultado do teste há evidências estatísticas de que o percentual médio de recuperação não difere para os tempos fixados (p -valor = 0,323). Para verificar as suposições básicas para aplicação da análise de variância realizamos os testes de normalidade de Shapiro-Wilks e Lilliefors, além do teste de homogeneidade de variâncias. Os p -valores dos testes de Shapiro-Wilks, Lilliefors e do teste de homogeneidade de variâncias foram 0,1155, 0,0545 e 0,0898, respectivamente. Dessa forma, as hipóteses de normalidade e homogeneidade de variâncias não são rejeitadas considerando um nível nominal de 5%. Apesar disso, conduzimos análises baseadas no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, já que os testes podem ser afetados consideravelmente pelo tamanho amostral. Novamente, considerando um nível de 5% não rejeitamos a hipótese de que não há diferenças entre os diferentes tempos de centrífuga (p -valor = 0,3429). Como indicado anteriormente, apesar dos testes não terem indicado resultados significativos, verifica-se a partir da Figura 31, que o resultado do percentual de recuperação com tempo de centrífuga 7,5min apresentou resultados mais expressivos, tanto em termos de percentual de recuperação quanto relacionado a sua variabilidade.

Tabela 26 - Análise descritiva da variável percentual de recuperação para os diferentes tempos de centrífuga.

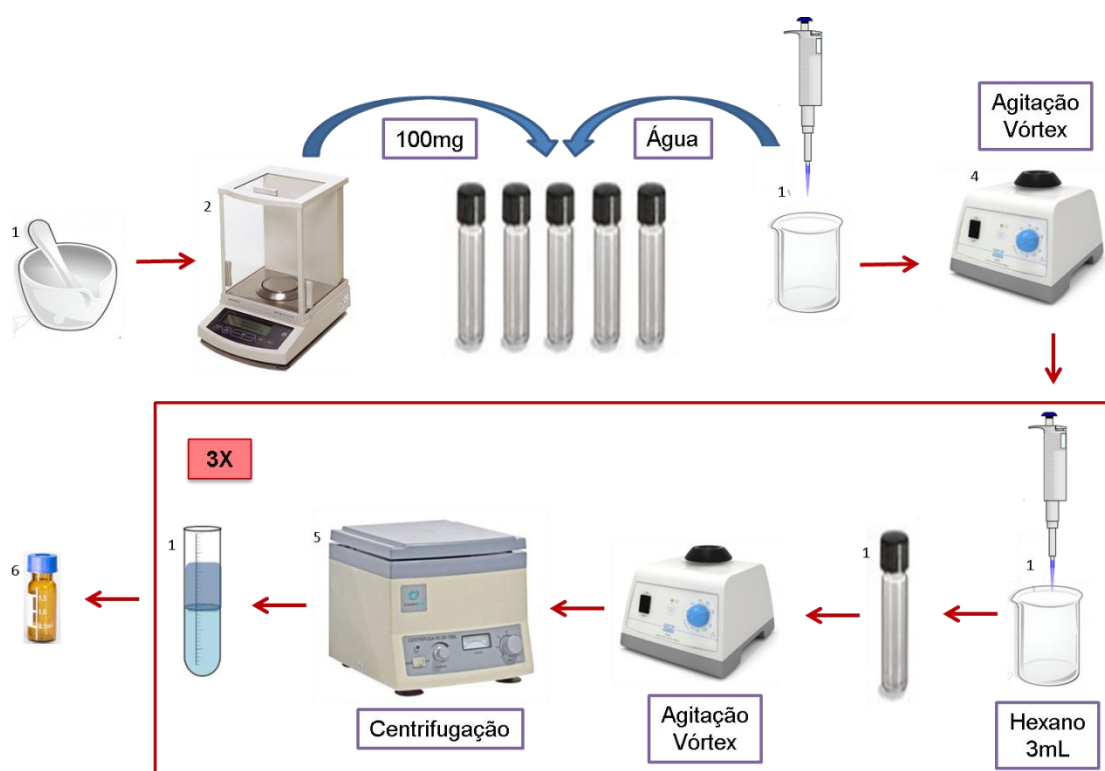
Estatística	Tempo de centrífuga		
	5 min	7,5 min	10 min
Média	95,94	97,09	93,43
Mediana	95,86	96,83	95,34
Mínimo	89,9	96,33	87,17
Máximo	102,1	98,33	98,43
Desvio padrão	5,13	0,76	4,98
Variância	26,29	0,57	24,78

Figura 31 - Percentual de recuperação para os diferentes tempos de centrifuga.



O método de extração em matriz sólida desenvolvido está representado no fluxograma da Figura 32.

Figura 32 - Fluxograma do método de extração em matriz sólida.



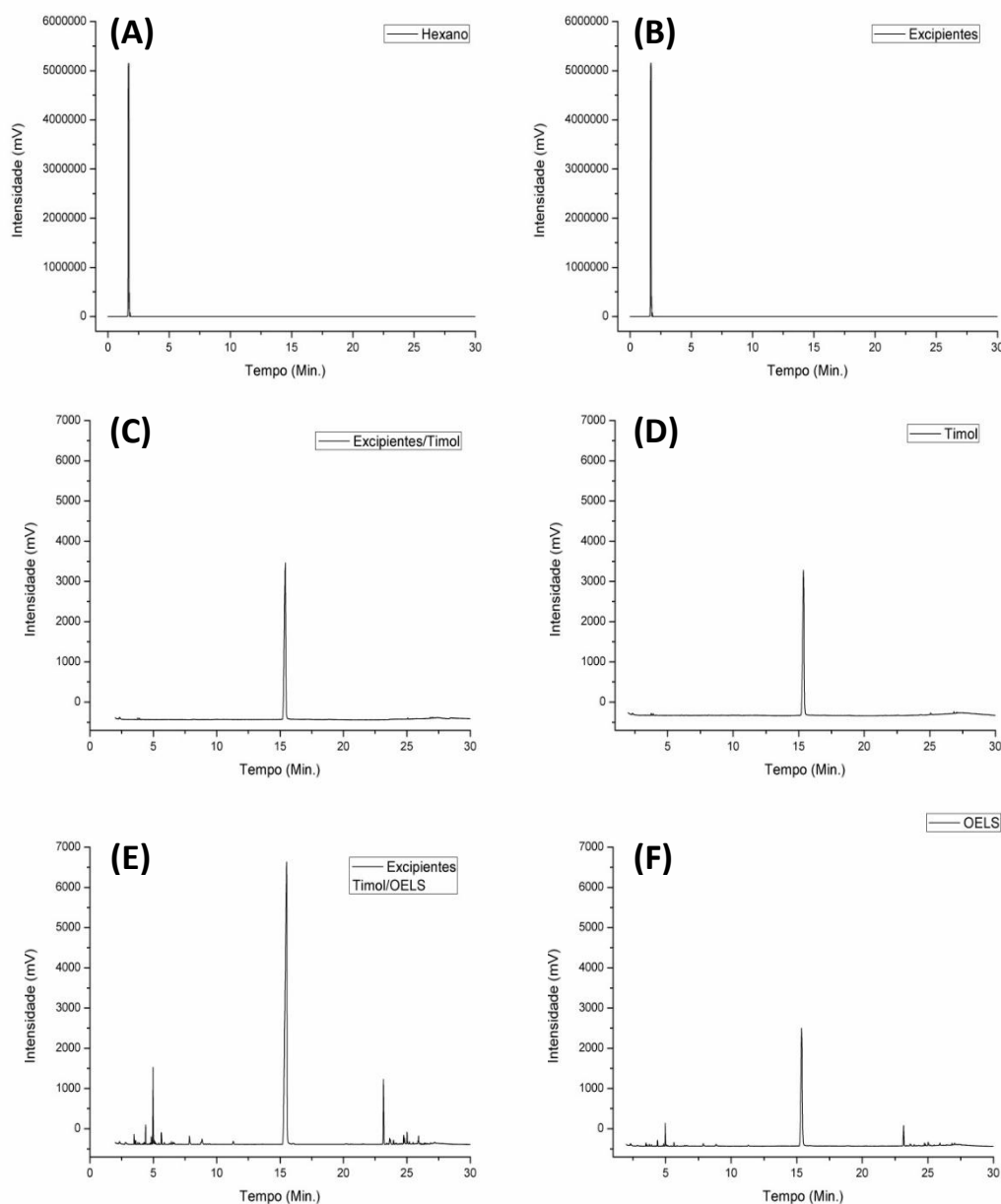
Fonte: Próprio autor

8.2.2 Validação da metodologia analítica

8.2.2.1 Seletividade

O método proposto de extração em matriz sólida mostrou-se seletivo, uma vez que foi possível quantificar o timol presente na fase hexânica obtida no processo de extração, apresentando um pico sem interferência de outras substâncias. Analisando os cromatogramas podemos observar que não houve presença de picos interferentes ou coeluição no tempo de retenção correspondente ao timol (Figura 33).

Figura 33 - Cromatogramas referentes à seletividade do método de extração em matriz sólida para quantificação do timol. (A) Hexano; (B) Excipientes (placebo); (C) Solução padrão de timol; (D) Excipientes/timol; (E) Excipientes/timol/OELS; (F) Solução de óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (OELS).



8.2.2.2 Linearidade

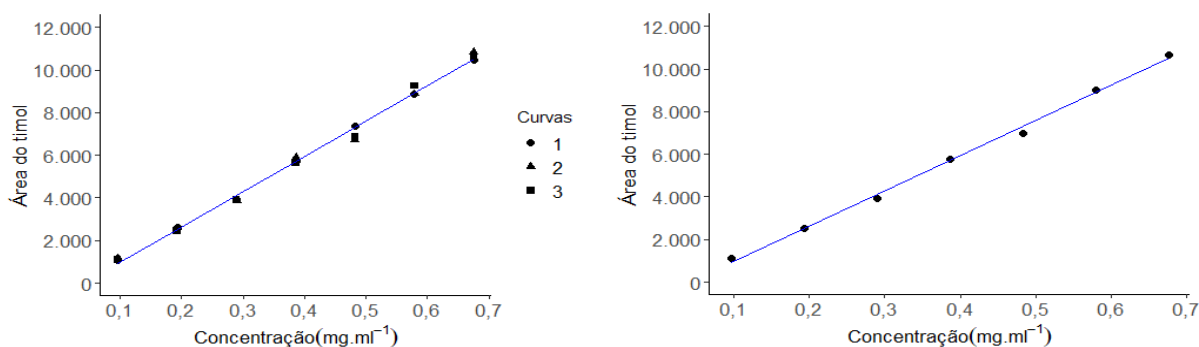
A curva de calibração do método foi obtida através de análises de soluções do padrão timol em concentrações diferentes (25%, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % e

175% da concentração teórica de 0,3860 mg mL⁻¹). As análises foram feitas em triplicata para cada um dos sete níveis como mostrado na Tabela 27 e a curva de calibração e linearidade média expressas na Figura 34.

Tabela 27 - Resultados obtidos para linearidade do timol.

Padrão (%)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Área timol Curva 1	Área timol Curva 2	Área timol Curva 3	CV%
25	0,0965	1087	1139	1081	2,89
50	0,1930	2604	2580	2437	3,55
75	0,2895	3921	3868	3921	0,78
100	0,3860	5702	5909	5656	2,34
125	0,4825	7355	6734	6879	4,65
150	0,5790	8867	8867	9251	2,46
175	0,6755	10442	10838	10670	1,87

Figura 34 - Curvas de calibração (C1, C2 e C3) e (B) linearidade média, obtidas para avaliação da linearidade do método de quantificação do timol a partir do método de extração em matriz sólida, utilizando CG-DIC.



Foram estimados os parâmetros do modelo ajustado considerando os valores médios das três curvas de linearidade. As estimativas dos parâmetros, erros padrão e p-valores associados aos parâmetros do modelo são apresentados na Tabela 28. O teste F de adequação global indica que há uma estrutura de regressão subjacente as variáveis concentração e área do timol ao nível de significância de 5% ($p\text{-valor} = 1,6 \times 10^{-7}$). O teste t para o parâmetro da variável concentração também sinaliza que essa variável é importante para prever a área do timol considerando os níveis usuais de significância ($p\text{-valor} < 0,05$). O R^2 associado ao modelo ajustado foi de 0,997, o que implica que a concentração explica 99,7% da variabilidade presente na área do timol.

Quanto a linearidade, verificamos que a reta de mínimos quadrados se ajusta adequadamente aos dados como apresentado na Figura 34.

Tabela 28 - Estimativas, erros padrão e p-valores para os parâmetros do modelo com os dados de linearidade média.

Coeficiente	Estimativa	erro padrão	p-valor
Intercepto	-671,8	173,7	0,0118
Concentração	16.520,5	402,5	0,0000

A equação da regressão linear ($y = 16.520,5x - 671,8$) e o coeficiente de correlação (R^2) de 0,997, demonstraram que as áreas obtidas são diretamente proporcionais às concentrações do timol, sendo o método considerado linear, estando o resultado obtido dentro do critério de aceitação $R^2 \geq 0,99$ (BRASIL, 2003).

8.2.2.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os valores dos limites de detecção e quantificação foram estimados com base nos resultados do ajuste da reta de mínimos quadrados aos dados. Considerando o erro padrão do intercepto e a estimativa do coeficiente da variável independente concentração (Tabela 28), os valores foram $0,032 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o limite inferior de detecção e $0,105 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o limite de quantificação apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Dados dos parâmetros de linearidade para o timol.

Padrão	Coeficiente de regressão linear (r^2)	Equação da curva de calibração $y = ax + b$	Limite de Detecção (mg mL^{-1})	Limite de Quantificação (mg.mL^{-1})
Timol	0,997	$y = 16.520x - 671,76$	0,032	0,105

8.2.2.4 Precisão

Para a análise da precisão intra-dia (repetibilidade) e precisão intermediária para o método de extração do timol em matriz sólida a partir da solução padrão de timol foram realizadas análises em três níveis de concentração do padrão, utilizando $125 \mu\text{L}$ (baixa), $250 \mu\text{L}$ (média) e $375 \mu\text{L}$ (alta) em relação à solução padrão na concentração de $9,650 \text{ mg mL}^{-1}$, resultando na concentração teórica de $0,1255 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,2610 \text{ mg mL}^{-1}$ e

0,3860 mg mL⁻¹ respectivamente. Foram feitas 6 determinações em cada nível de concentração, levando em consideração o desvio padrão relativo máximo de 5 %. (Tabela 30 e Tabela 31).

Tabela 30 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade para o método de extração do timol em matriz sólida a partir da solução padrão de timol.

Nível de Concentração	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	0,1069 $\pm$ 0,0015	1,39
Média	0,2451 $\pm$ 0,0047	1,90
Alta	0,3900 $\pm$ 0,0050	1,27

* Média de seis determinações.

Tabela 31 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária para o método de extração do timol em matriz sólida.

Nível de Concentração	Análise	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	1ª precisão	0,1111 $\pm$ 0,0040	3,62
	2ª precisão	0,1055 $\pm$ 0,0020	1,60
	Média	0,1083 $\pm$ 0,0042	3,84
Média	1ª precisão	0,2404 $\pm$ 0,0050	2,21
	2ª precisão	0,2503 $\pm$ 0,0020	0,64
	Média	0,2454 $\pm$ 0,0064	2,60
Alta	1ª precisão	0,3864 $\pm$ 0,0040	0,93
	2ª precisão	0,3975 $\pm$ 0,0070	1,64
	Média	0,3920 $\pm$ 0,0077	1,96

* Média de seis determinações.

Já a repetibilidade e precisão intermediária para o método de extração do timol a partir da solução contaminada foram realizadas análises em três níveis de concentração do padrão e da solução de óleo essencial, utilizando 125 μ L (baixa), 250 μ L (média) e 375 μ L (alta) de cada solução, partindo da solução padrão de timol e da solução de óleo essencial, na concentração de 9,650 mg.mL⁻¹ e 9,432 mg.mL⁻¹ respectivamente, resultando na concentração teórica de 0,2260 mg.mL⁻¹, 0,4401 mg.mL⁻¹ e 0,6432 mg.mL⁻¹.

¹ para a solução contaminada. Foram feitas 6 determinações em cada nível de concentração, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 32 e 33.

Tabela 32 - Valores experimentais obtidos no ensaio de repetibilidade para o método de extração do timol a partir da solução contaminada.

Nível de Concentração	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	0,1981 $\pm$ 0,0023	1,15
Média	0,4333 $\pm$ 0,0030	0,70
Alta	0,6834 $\pm$ 0,0084	1,22

Tabela 33 - Valores experimentais obtidos no ensaio de precisão intermediária para o método de extração do timol a partir da solução contaminada.

Nível de Concentração	Análise	Concentração Média Determinada* $\pm$ DP	DPR (%)
Baixa	1ª precisão	0,1960 $\pm$ 0,0058	2,94
	2ª precisão	0,1987 $\pm$ 0,0040	2,02
	Média	0,1974 $\pm$ 0,0049	2,50
Média	1ª precisão	0,4315 $\pm$ 0,0062	1,44
	2ª precisão	0,4318 $\pm$ 0,0099	2,30
	Média	0,4316 $\pm$ 0,0079	1,83
Alta	1ª precisão	0,6659 $\pm$ 0,0083	1,25
	2ª precisão	0,6904 $\pm$ 0,0067	1,98
	Média	0,6782 $\pm$ 0,0147	2,16

* Média de seis determinações.

A precisão intra-dia para o método de extração do timol na matriz sólida apresentou valores de DPR entre 1,27-1,90% enquanto a precisão intermediária apresentou DPR entre 1,96-3,84%. Para o método de extração do timol a partir da solução contaminada os valores de DPR ficaram entre 0,70-1,22% enquanto a precisão intermediária apresentou DPR entre 1,83-2,50%. Assim o método foi considerado

preciso, uma vez que os valores de DPR encontram-se dentro do limite especificado, ou seja, inferior a 5%.

8.2.2.5 Exatidão

Para análise da exatidão dos resultados foram avaliados três níveis de concentração para recuperação, baixa (50 %), média (100 %) e alta (150 %), com 6 determinações em cada nível conforme apresentado nas Tabelas 34 e 35.

Tabela 34 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de extração do timol em matriz sólida.

Nível de Concentração	Concentração Teórica (mg.mL ⁻¹)	Concentração Média Determinada*	Erro absoluto	Erro relativo	Recuperação (%)
Baixa	0,1255	0,1198	0,045	4,50	95,50
Média	0,2610	0,2504	0,039	3,39	96,10
Alta	0,3860	0,3864	0,001	0,10	100,10

* Média de seis determinações.

Tabela 35 - Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de extração do timol em matriz sólida a partir da solução contaminada.

Nível de Concentração	Concentração Teórica (mg.mL ⁻¹)	Concentração Média Determinada*	Erro absoluto	Erro relativo	Recuperação (%)
Baixa	0,2260	0,2156	0,046	4,60	95,40
Média	0,4401	0,4315	0,020	1,96	98,04
Alta	0,6432	0,6659	0,035	3,53	103,53

Segundo a Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA, os resultados mostram que o método se apresenta adequado em relação à exatidão, pois os valores médios de recuperação estão dentro da faixa de 95 a 105% (BRASIL, 2003).

8.2.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir de modificações deliberadas nas condições e parâmetros de análise do método proposto, sendo verificada a variação do

volume de água usado no processo, tempo de agitação em vórtex e tempo de centrifugação, sendo apresentados os resultados na Tabela 36.

Tabela 36 - Resultado obtido para robustez do método de extração do timol em matriz sólida na solução de timol e na solução contaminada para variação de volume de água usado no processo, tempo de agitação em vórtex e tempo de centrifugação.

Amostras	Condições		Conc. Teórica (mg.mL ⁻¹)	CMD*	Recuperação (%)	Média ± DP	DPR (%)
	Água/Vórtex/ Centrifugação						
Método proposto	3mL 5min. Vórtex 10 min. Centrifugação		0,2610	0,2499	95,74	0,2499 ± 0,003	1,15
Timol	Água	1,5 mL	0,2610	0,2542	97,40	0,2521 ± 0,004	1,45
		4,5 mL	0,2610	0,2480	95,02	0,2490 ± 0,002	0,85
	Vórtex	2,5 min.	0,2610	0,2483	95,13	0,2491 ± 0,002	0,86
		7,5 min.	0,2610	0,2526	96,78	0,2513 ± 0,002	0,93
	TC	5 min.	0,2610	0,2552	97,77	0,2526 ± 0,007	2,72
		7,5 min.	0,2610	0,2527	96,82	0,2513 ± 0,003	1,03
Método proposto	1,5mL 5min. Vórtex 7,5 min. Centrifugação		0,4401	0,4392	99,80	0,4392 ± 0,005	1,11
Solução Contaminada	Água	3 mL	0,4401	0,4595	104,41	0,4494 ± 0,014	3,04
		4,5 mL	0,4401	0,4545	103,27	0,4468 ± 0,009	2,08
	Vórtex	2,5 min.	0,4401	0,4495	102,14	0,4443 ± 0,008	1,89
		7,5 min.	0,4401	0,4614	104,85	0,4503 ± 0,013	2,99
	TC	5 min.	0,4401	0,4620	104,98	0,4506 ± 0,013	2,86
		10 min.	0,4401	0,4445	101,00	0,4419 ± 0,009	1,94

* Concentração média determinada (CMD) em três determinações; TC = tempo de centrifugação.

8.3 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, foi possível desenvolver um método analítico para extração de timol em matriz sólida, a partir do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. O processo de extração permite que seja feita a quantificação do componente majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. por CG-DIC, método que foi anteriormente validado e assim controlar a qualidade do produto intermediário obtido. Este método foi validado conforme as normas preconizadas pela ANVISA através da Resolução nº 899, de 2003, atendendo aos requisitos necessários para um método analítico.

CAPÍTULO VII

9. DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO OELS ATRAVÉS DO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO

9.1 Materiais e Métodos

9.1.1 Materiais

O óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (OELS) foi obtido por extração no Laboratório de Fitoquímica Dr Raimundo Braz Filho na UFPB, o óleo mineral (100%) foi adquirido da CIMED[®], o Tween[®] 80 foi obtido da Sigma-Aldrich[®], o lauril sulfato de sódio e a maltodextrina foram fornecidos pela Farmácia de manipulação Dilecta[®], a carboximetilcelulose pela Farmácia de manipulação ArtFarma[®] e o hidroxipropilmetilcelulose pela Farmácia de manipulação Teixeira[®].

9.1.2 Desenvolvimento da preparação das micropartículas

Para o processo de microencapsulação, se fazia necessário o preparo de uma emulsão com o óleo essencial e demais excipientes para posterior congelamento e liofilização. Foram realizados diversos testes para determinar a concentração e o tipo de tensoativo a ser utilizado, assim como a ordem e a proporção dos excipientes e definir o tempo de agitação, desenvolvendo uma metodologia para preparação das micropartículas a partir de uma emulsão estável.

9.1.3 Congelamento e liofilização

Logo após a preparação, as emulsões foram transferidas para recipientes de plástico e congeladas em um ultra freezer 80V QUIMIS[®], com temperatura de aproximadamente -80°C, por um período de 13 horas. Após o congelamento, as amostras foram imediatamente levadas para secagem no liofilizador (LIOTOP L101), previamente ligado e na temperatura entre -45 ± 5°C. A pressão do liofilizador, permaneceu abaixo de 500mmHg durante todo o processo. O tempo para completa secagem por liofilização foi de 13 ± 1h. Após a secagem, as amostras foram armazenadas em recipiente fechado protegidas da luz e em dessecador com sílica.

9.1.4 Delineamento experimental

Na tentativa de obter as melhores condições para produção de micropartículas contendo OEELS através do método de liofilização foi realizado um delineamento experimental a partir de um planejamento fatorial do tipo 2^3 , ou seja, 3 fatores foram testados em 2 níveis diferentes (baixo e alto). Para o desenvolvimento das micropartículas e verificação do processo de encapsulação mais adequado, foi avaliada a influência de alguns excipientes na preparação. Assim, foram analisados os efeitos individuais e os efeitos entre os excipientes lauril sulfato de sódio (LSS) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a proporção do óleo essencial em relação à maltodextrina (MD). As variações utilizadas estão dispostas na Tabela 37.

Tabela 37 - Fatores e níveis analisados no planejamento fatorial 2^3 .

Fatores	Níveis	
	-1	+1
OEELS	500 μ L	250 μ L
HPMC	0	250 mg
LSS	50 mg	100 mg

O planejamento fatorial 2^3 gera 8 combinações de experimentos, sendo também realizado um experimento no ponto médio que compreende os valores entre -1 e +1, totalizando 9 experimentos. O ponto médio (0) foi definido com a seguinte combinação: 375 μ L de OEELS, 75 mg de LSS e 125 mg de HPMC. Na Tabela 38 são apresentadas as combinações possíveis.

Tabela 38 - Combinações possíveis do planejamento fatorial 2³.

Experimento	OELS	HPMC	LSS
1	-1	+1	-1
2	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	+1	-1	-1
7	+1	+1	+1
8	+1	-1	+1
9	0	0	0

Os experimentos foram realizados no mesmo dia, sem réplica, seguindo a metodologia descrita no preparo da emulsão. Foi preparada também uma emulsão placebo em que foi utilizado o óleo mineral, que não apresenta atividade antimicrobiana, como substituinte do OELS. Após a preparação, as amostras foram imediatamente congeladas e em seguida liofilizadas.

9.1.5 Caracterização da micropartícula

9.1.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise das micropartículas, contendo OELS, foi realizada no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) no Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba no Microscópio Eletrônico de Varredura SEM ZEISS® LEO 1430, com o programa SmartSEM®. As amostras foram preparadas em stub de metal, sendo o pó do microparticulado pulverizado sobre fita dupla de carbono e posteriormente metalizadas em ouro por 1,5 minutos no metalizador K550X - Emitech® antes das análises. Após o preparo, as amostras foram imediatamente analisadas, sendo as fotomicrografias obtidas em uma câmera com tensão de excitação de 15KV.

9.1.5.2 Tamanho de partícula - FlowCam®

A técnica de FlowCam® consiste em uma ferramenta analítica de medida de tamanho e forma das partículas, fornecendo resultados precisos em todas as partículas de 1 µm a 2 mm (contagem) e 4 µm a 2 mm (forma). A amostra de micropartículas contendo OELS foi submetida a análise de tamanho e forma de partículas, usando o FlowCam®, sendo avaliado o diâmetro mínimo de 10 e máximo de 10.000 microns, capturando e armazenando a imagem digital de cada partícula em 10 quadros por segundo.

9.1.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foi realizado o estudo de compatibilidade física entre o óleo essencial e os excipientes usados na preparação da micropartícula por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As curvas DSC foram obtidas através de um calorímetro da Shimadzu®, modelo DSC-50, de 25 – 300°C, sendo utilizado cadinho de alumínio hermeticamente selado com cerca de 3 mg da amostra de cada excipiente, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, submetida ao aquecimento nas razões de 2, 5, 10, 20, e 40°C.min⁻¹. Para calibração da célula de DSC foi utilizado índio (pf 156,2°C; $\Delta H_{fus} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) e zinco (pf. 419,4°C). A análise dos dados obtidos por DSC foi realizada utilizando o software TASYs, da Shimadzu®, sendo observados e avaliados processos endotérmicos, exotérmicos e eventos de perda de massa ou degradação da amostra.

9.1.5.4 Infravermelho (FTIR)

A obtenção dos espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. e excipientes foi realizada através do espectrofotômetro Shimadzu® IR modelo Prestige-21 com acessório de reflectância total atenuada (do inglês, ATR) acoplado, apresentando as seguintes condições de análise: Região 4000-600 cm⁻¹; Resolução: 4 cm⁻¹; N° acumulações: 20 e Modo: transmitância. Os dados obtidos foram analisados a partir do programa IR-solutions da Shimadzu®.

9.1.6 Atividade antimicrobiana da micropartícula

9.1.6.1 Ensaio de difusão em ágar

Para realização do ensaio de difusão, foi necessário solubilizar o microparticulado obtido para permitir a liberação dos ativos e verificar sua atividade antimicrobiana e antifúngica.

Inicialmente, foi usado o Tween 80[®] por ter sido o tensoativo empregado para dissolução dos óleos essenciais do estudo, porém outras alternativas foram usadas para verificação da liberação do ativo. Assim, o microparticulado foi submetido a testes com o Tween 80[®] a 2,5, 5 e 10%, uma mistura de 1:1 de Tween 80[®] a 5% e DMSO a 10%, apenas DMSO a 5 e 10%, LSS 0,5, 1,0, 1,5 e 2% e Cremophor[®] RH40. Todas as soluções preparadas apresentaram aparente dissolução das micropartículas.

Para os testes de difusão em ágar foi vertido exatamente 15 mL de BHI ágar ou Sabouraud ágar em placas de petri. Após a solidificação do meio, foi colocado por imersão o inóculo, previamente padronizado (*S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*), produzindo uma camada uniforme em toda superfície do meio. Com o auxílio de uma ponteira estéril, poços foram feitos no meio de cultura para colocação de 50 µL de cada uma das soluções preparadas. Como controle positivo foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo foi usado o tensoativo utilizado na preparação da solução. As medidas dos halos de inibição (mm) foram realizadas após 24h (*S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e 48h (*C. albicans*) de incubação em estufa $\pm 37^{\circ}\text{C}$, utilizando um paquímetro (BAUER et al., 1966). Todos os testes foram realizados em triplicata.

9.2 Resultados e Discussão

9.2.1 Desenvolvimento da preparação da micropartícula

Para o preparo da emulsão, inicialmente foi utilizado o tensoativo Tween[®] 80 para solubilização do OELS nas concentrações de 0,1 e 0,5% e a maltodextrina (MD) como agente encapsulante, sendo utilizada uma quantidade de 10 g para 1 mL do OELS. Para

preparação foi utilizado 50 mL de água destilada, sendo adicionado o Tween[®] 80 (0,1%) sob agitação que foi mantida por dois minutos antes da adição do OELS. Após 5 minutos de agitação foi adicionada aos poucos a maltodextrina, sendo mantida a agitação, porém houve separação de fases. Seguindo o mesmo procedimento, foi utilizado o Tween[®] 80 na concentração de 0,5%, mas a mistura ficou esbranquiçada e também houve separação de fases, sendo possível a visualização de gotículas sob a superfície.

Ainda mantendo a condição de preparação anterior, o Tween[®] 80 foi adicionado aos poucos sob agitação constante até atingir 5%. Apesar da alta concentração de Tween[®] 80 ainda era possível observar as gotículas na superfície.

Na tentativa de obter uma emulsão homogênea, adicionou-se à preparação a carboximetilcelulose (CMC) e o agente tensoativo lauril sulfato de sódio (LSS). Em 20 mL de água destilada foi adicionado o Tween[®] 80 ou o LSS, ambos na concentração de 2%, seguido da adição do OELS gota a gota, da maltodextrina e por último a CMC. Todo o preparo foi executado sob agitação constante, sendo mantida por 5 minutos antes da adição do constituinte seguinte.

Ambas preparações foram submetidas ao congelamento e a liofilização. Na preparação que utilizou o Tween[®] 80, ainda foi possível observar uma separação de fases, ficando mais acentuada após o congelamento, sendo visível uma camada amarelada na superfície. Após a determinação do teor do timol foi verificado uma baixa recuperação quando aplicado o método analítico, sendo necessário adição de um agente de revestimento derivado de celulose, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

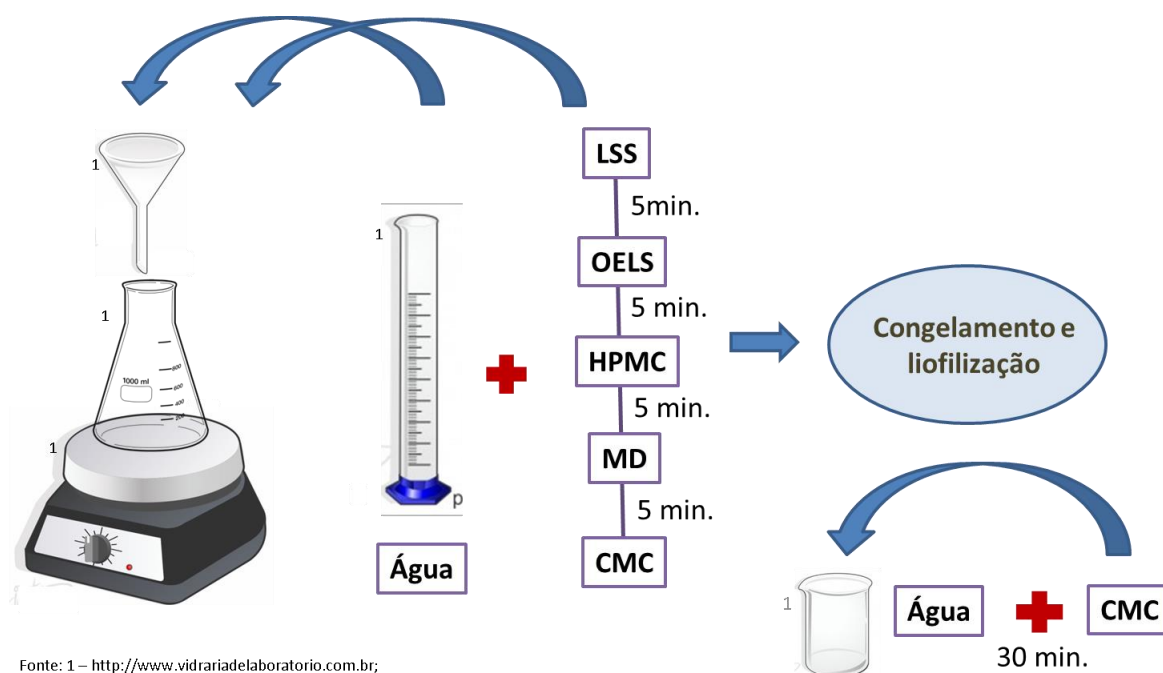
A MD foi utilizada como agente encapsulante. O HPMC como agente de revestimento. O LSS é um agente surfactante aniônico, que consiste em uma molécula anfifílica, que aumenta a taxa de dissolução de compostos pouco solúveis em água. Também auxilia na miscibilidade física dos ativos com polímeros hidrofílicos, evitando a sua precipitação em meio aquoso, na maioria das vezes formando micelas carregadas com fármacos (JUNG et al., 2016). A CMC, derivada da celulose, foi utilizada para aumentar a viscosidade da emulsão e, conseqüentemente, a sua estabilidade. Este agente espessante é bastante utilizado nas indústrias de alimentos e de medicamentos (SINGH et al., 2016).

Na preparação das emulsões, todos os constituintes foram adicionados sob agitação magnética, em temperatura ambiente. Em todos os testes, o LSS foi o primeiro excipiente a ser utilizado, sendo seu conteúdo adicionado em água com a finalidade de solubilizar o OELS, que é uma substância lipofílica. Antes da adição do constituinte seguinte, a agitação era mantida por 5 minutos. Após a agitação com o ativo, os outros excipientes, previamente pesados, eram adicionados aos poucos, com o auxílio de um funil de vidro. Foi verificado que havia a formação de alguns grumos gelatinosos em algumas preparações que não se desfaziam facilmente e não secavam completamente no processo de liofilização.

No intuito de saber em que momento estes grumos estavam sendo formados, os excipientes passaram a ser adicionados um a um, seguindo a sequência: LSS, OELS, HPMC, MD e CMC com um intervalo de 5 minutos de agitação entre eles. Assim, foi percebido que, ao adicionar a CMC, algumas amostras apresentavam estas estruturas de aspecto gelatinoso. Dessa forma, foi necessária a solubilização da CMC antes de ser adicionada ao sistema, usando metade da água utilizada para o preparo da emulsão. O excipiente foi colocado num becker com a água e deixado em repouso por aproximadamente 30 minutos. Nesse tempo a CMC entumescia e solubilizava completamente.

Após a realização dos testes, foi definida a ordem de adição dos constituintes da emulsão, seguindo a sequência: Água, LSS, OELS, HPMC, MD e CMC previamente solubilizada, havendo 5 minutos de agitação após cada adição, como mostra a Figura 35.

Figura 35 - Sequência de preparação da emulsão.



9.2.2 Planejamento Fatorial

No desenvolvimento tecnológico de novos produtos, o planejamento fatorial consiste de uma ferramenta importante para avaliar a influência dos excipientes e suas concentrações no formulado em desenvolvimento, definindo uma otimização na obtenção baseado em parâmetros de eficiência e qualidade. Dessa forma, esta etapa do desenvolvimento foi definida baseada nas características intrínsecas do OELS e das propriedades físico-químicas dos excipientes, bem como suas proporções utilizadas nos estudos tecnológicos descritos na literatura.

Na Tabela 39 estão descritos os valores obtidos na recuperação do timol a partir do microparticulado, contendo OELS e na Tabela 40, são apresentados os dados estatísticos (Anova) para o planejamento fatorial 2^3 .

Tabela 39 - Valores obtidos na recuperação do timol a partir do microparticulado, contendo OELS.

Experimentos	OELS (μ L)	HPMC (mg)	LSS (mg)	Recuperação* (%)
Condição 1	500	250	50	79,4
Condição 2	500	0	50	41,8
Condição 3	500	250	100	66,6
Condição 4	500	0	100	53,0
Condição 5	250	250	50	72,7
Condição 6	250	0	50	39,3
Condição 7	250	250	100	72,8
Condição 8	250	0	100	56,0
Condição 9 (PM)	375	125	75	37,8

* Média de recuperação de 3 experimentos independentes de cada condição. PM = ponto médio.

Observou-se que o percentual do teor de timol nas micropartículas foi influenciado dentre as condições do delineamento experimental pela adição de HPMC a mistura, podendo perceber que as condições experimentais que continham HPMC apresentaram maior percentual de recuperação de timol, conforme é possível constatar a partir do gráfico de superfície (Figura 36) e da análise de variância gerada para o planejamento fatorial neste experimento, onde o valor de $p \leq 0,05$, ao nível de significância de 95%, e F tabelado (19,35) > F crítico (4,38), demonstram diferença estatística entre os tratamentos para a recuperação do timol (Tabela 40). O gráfico de Pareto representado na Figura 37 permite visualizar de forma mais clara que apenas o HPMC apresentou influência significativa no teor de timol em relação as outras variáveis analisadas.

Tabela 40 – Dados estatísticos (Anova) para o planejamento fatorial 2^3 aplicada à recuperação do timol a partir do microparticulado, contendo OELS.

FV	GL	SQ	QM	F	P	
OELS%	1	0,005	0,005	0,00002	0,996242	NS
LSS	1	86,298	86,298	0,43321	0,518316	NS
HPMC	1	3854,468	3854,468	19,34890	0,000309	*
OELS%*LSS	1	127,836	127,836	0,64172	0,432994	NS
OELS%*HPMC	1	0,388	0,388	0,00195	0,965277	NS
LSS*HPMC	1	614,385	614,385	3,08413	0,095167	NS
OELS%*LSS*HPMC	1	20,039	20,039	0,10059	0,754581	NS
Resíduo	19	3784,964	199,209			
TOTAL	26	8488,382				

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; * = Significativo; NS = Não Significativo; F tabelado = 4,38.

Figura 36 - Gráfico de superfície para recuperação das amostras obtidas a partir do planejamento fatorial.

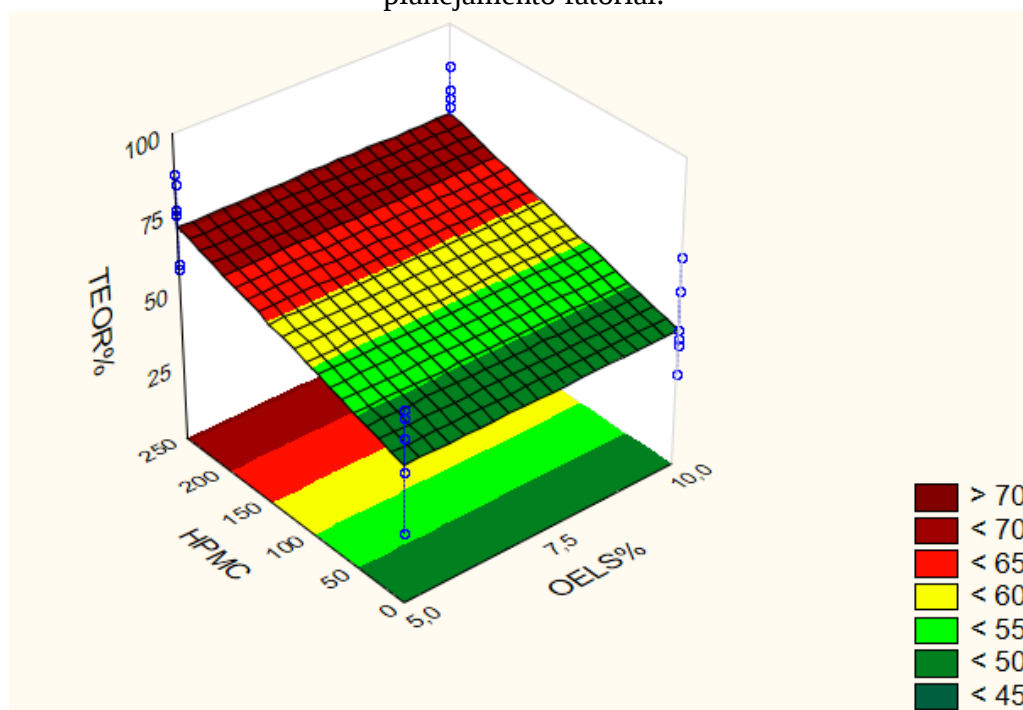
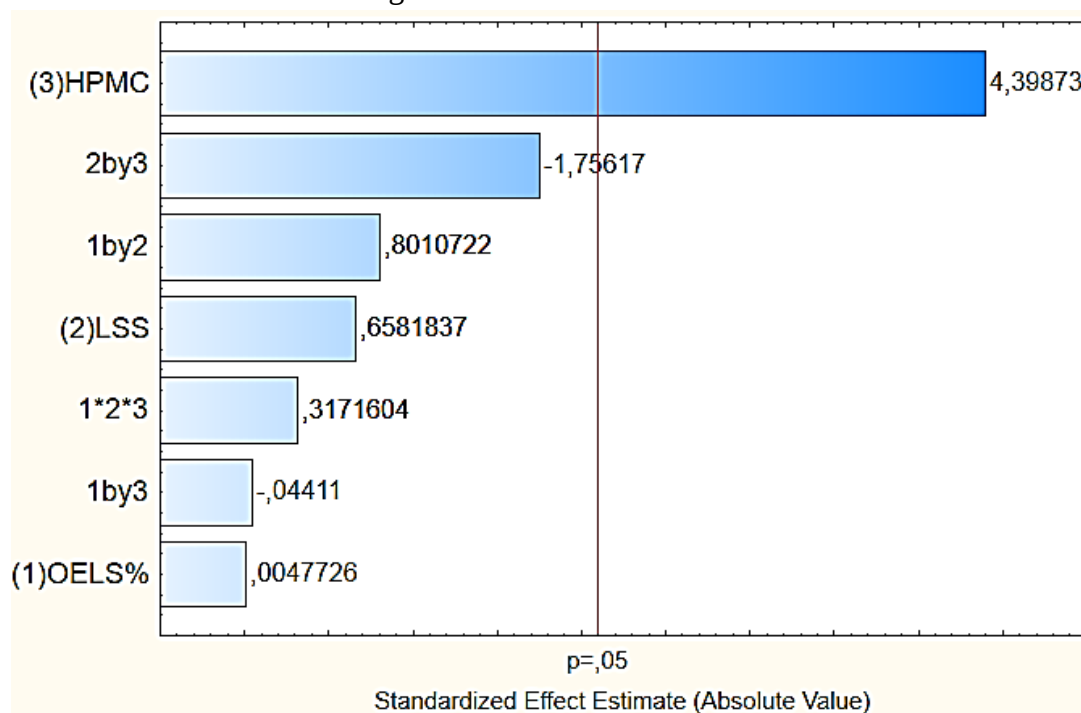


Figura 37 - Gráfico de Pareto.

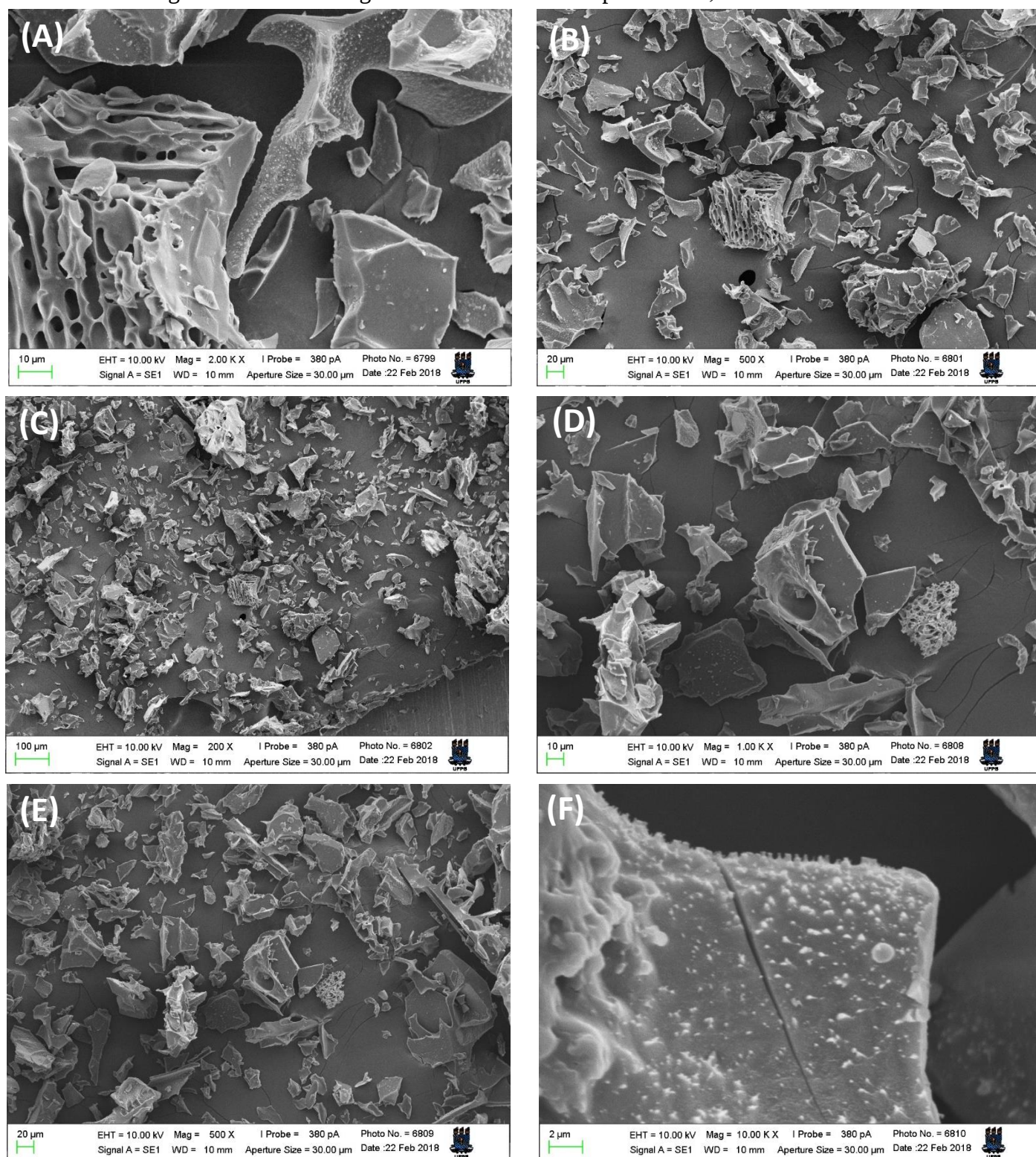


9.2.3 Caracterização da micropartícula

9.2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 38 são apresentadas as fotomicrografias obtidas para a amostra de micropartículas, contendo OELS.

Figura 38 - Fotomicrografias de MEV do microparticulado, contendo OELS.



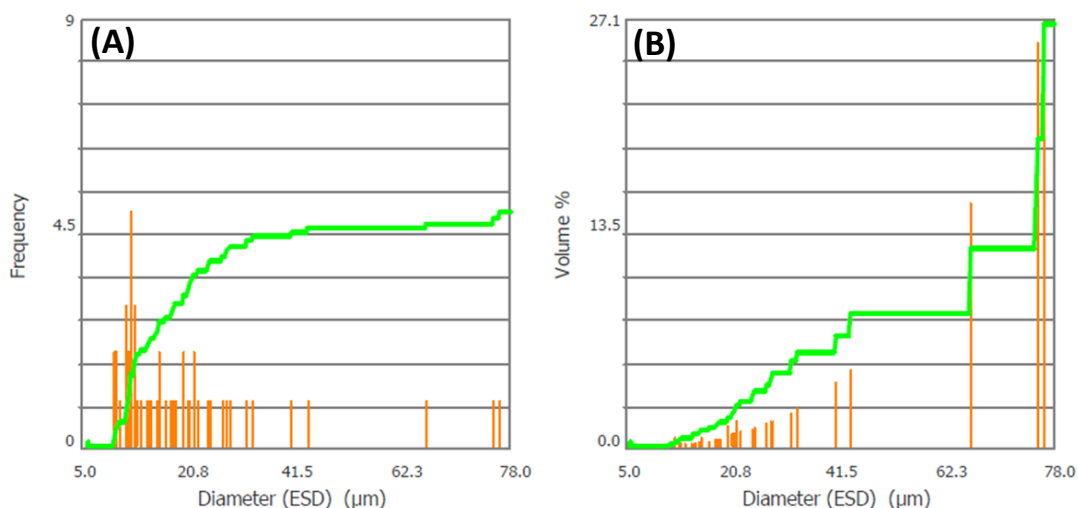
Nas fotomicrografias (A) e (B) observamos partículas irregulares com estrutura laminada de variados tamanhos entre 10 micra e 100 micra, evidenciando poros em

partículas isoladas. A figura (C) evidencia uma estrutura reticulada com micropartículas agregadas na superfície com formas laminadas com distribuição uniforme. Na análise das fotomicrografias (D, (E) e (F) podemos definir uma estrutura formada em dois níveis, sendo o primeiro com aspecto sólido laminado de natureza reticular e um segundo com partículas irregulares com microgotículas uniformes aderidas na superfície e no interior dos poros.

9.2.3.2 Análise do Tamanho de partícula

As micropartículas contendo OELS também foram analisadas, usando o FlowCam®. Os dados mostram um diâmetro médio de $22,25 \pm 14,94 \mu\text{m}$ com variação de 67,14% (Figura 39A). A análise de partículas baseada em volumetria não fornece informações sobre a forma das partículas, assumindo que todas as partículas são esféricas, gerando uma relação volume versus diâmetro que evidencia uma variação no tamanho e uma distribuição irregular (Figura 39B).

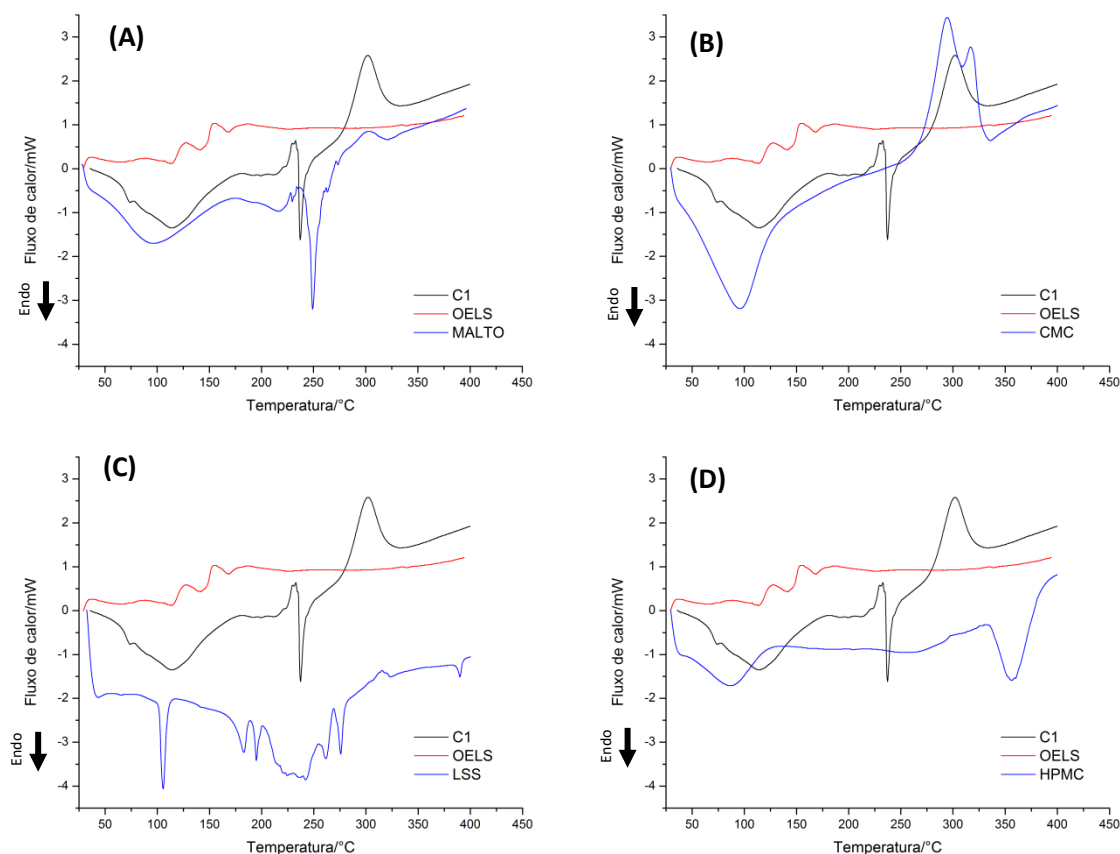
Figura 39 - Gráficos de tamanho de partículas (A) e forma (B) do microparticulado, contendo OELS por FlowCam®.



9.2.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A comparação entre as curvas do óleo essencial, da micropartícula contendo o OELS e os excipientes usados, são apresentados na Figura 40. Os eventos do DSC para o OELS, microparticulado (MP), maltodextrina (MD), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC) e laurilsulfato de sódio (LSS), com o registro da ΔT ($T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}} - T_{\text{pico}}$) em $^{\circ}\text{C}$ e ΔH (J.g^{-1}) para todos os eventos são apresentados na Tabela 41.

Figura 40 - Curvas de DSC do óleo de *L. sidoides* (OELS), Micropartícula (C1) e os excipientes (A) maltodextrina (MALTO), (B) carboximetilcelulose (CMC), (C) laurilsulfato de sódio (LSS) e (D) hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).



Na curva de DSC do OELS (Figura 40A) foi possível observar três picos endotérmicos consecutivo correspondente a volatilização dos multicomponentes, característico dos óleos essenciais que normalmente são constituídos por vários compostos voláteis, que correspondem mais de 95% dos constituintes do total dos seus

componentes (PAULA et al., 2011). Tal fato pode ser explicado pelas diferenças na pressão de vapor desses compostos presentes no óleo. A curva de DSC do microparticulado apresentou três picos endotérmicos, assumindo um perfil térmico semelhante a maltodextrina, sendo observando mudanças nas temperaturas dos picos com diminuição da entalpia no terceiro processo, estas alterações podem ser devido a interação física dos outros excipientes que compõem o microparticulado e a influência do processo de secagem por liofilização. O quarto processo exotérmico no microparticulado corresponde a sobreposição dos eventos que ocorrem na maltodextrina e no CMC com alterações nos valores de entalpia (Figura 40B). Na figura 40C o processo de fusão do LSS ocorre em 101,77 °C, seguindo de uma série de eventos endotérmicos de decomposição na faixa de 174,88 a 387,52, influenciando com menor intensidade no comportamento térmico do microparticulado, devido a menor proporção utilizada na formulação. Na figura 40D observou-se dois processos na curva de DSC do HPMC, o primeiro correspondente ao processo de volatilização da água e um segundo relacionado a degradação na faixa de 340,43 a 400°C, porém sua influência na alteração está associada a interação dos outros excipientes, devido ao fato da proporção 0,5% na formulação estudada.

Tabela 41 – Eventos do DSC para o OELS, microparticulado (C1), maltodextrina (MALTO), hidroxipropilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC) e laurilsulfato de sódio (LSS), com o registro da ΔT ($T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}} - T_{\text{pico}}$) em $^{\circ}\text{C}$ e ΔH (J.g^{-1}).

Amostra	Evento 1		Evento 2		Evento 3		Evento 4		Evento 5		Evento 6	
	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH
	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})	$T_{\text{onset}} - T_{\text{endset}}$ (T_{pico})	(J.g^{-1})
OELS	108,9 - 122,2 (113,8)	10,5	134,5 - 151,6 (141,3)	10,9	160,2 - 174,7 (168,4)	3,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C1	68,1 - 76,5 (74,2)	1,7	79,8 - 150,8 (113,5)	78,2	236,6 - 240,3 (236,8)	15,8	282,7 - 317,9 (301,8)	73,1	-----	-----	-----	-----
MALTO	57,7 - 160,3 (96,3)	125,1	246,1 - 253,4 (249,1)	36,8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HPMC	50,3 - 118,1 (87,1)	69,9	340,4 - 381,5 (356,3)	90,3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CMC	54,9 - 121,9 (95,8)	192,7	275,1 - 305,5 (294,6)	67,3	311,3 - 326,4 (316,7)	16,4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LSS	101,8 - 109,6 (105,5)	22,8	174,9 - 186,4 (182,9)	13,2	192,6 - 197,9 (194,8)	6,6	257,8 - 269,3 (261,8)	9,5	271,6 - 279,2 (275,8)	10,9	387,5 - 392,7 (390,0)	2,7

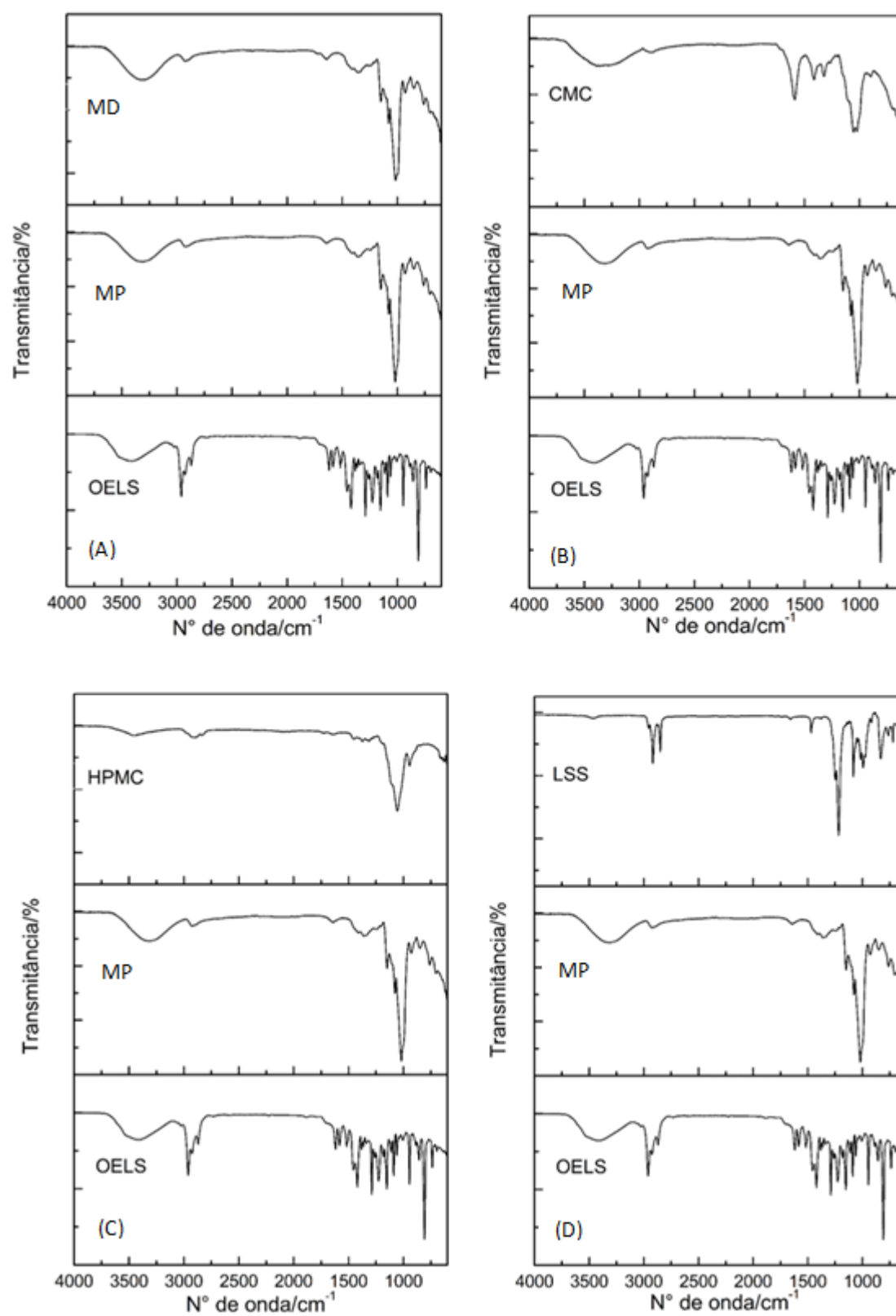
9.2.3.4 Infravermelho (FTIR)

A partir do espectro de FTIR (Figura 41) foram definidas as bandas de absorção dos principais grupos funcionais presentes no óleo essencial de *L. sidoides* Cham., nas micropartículas obtidas e nos excipientes usados na formulação que podem ser visualizados na Tabela 42.

Tabela 42 – Principais bandas de absorção do OELS, micropartículas e excipientes a partir do FTIR.

	Grupo funcional						
	Banda de absorção (cm ⁻¹)						
	O-H	C-O	C=C	C=C	C=C	C=C	
OELS (literatura)	3600	1200	1450	1500	1580	1600	
OELS (ATR)	3429	1226	1456	1516	1583	1618	
MP	3327	1203	-	-	-	1633	
MD	O-H	C-O			Anel de anidroglicose		
	3309	1149-1016			928-759		
CMC	O-H	COO- Na ⁺	C=O	C=O	C-OH	O-H	C-H
	3264	1587	1412	1323	1055	1022	900
HPMC	O-H	C-H	C-H	O-H	CH-OH	C-O	Grupo alcoólicos
	3477	2893	2833	1622	1373	1057	945/648
LSS	C-H	C-H ₂	C-H ₃	C-H	S=O	S-C-O	
	2955	2916	2849	1468	1217	1082	

Figura 41 - Espectros de FTIR do OELS, microparticulado (MP) e excipientes.



Segundo Paula e colaboradores (2011), no espectro de FTIR do OELS observam-se em sua maioria bandas características de absorções do anel aromático (1450 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} e 1600 cm^{-1}), da hidroxila fenólica (3600 cm^{-1}) e da ligação C-O (1200 cm^{-1}), as quais estão presentes na estrutura do timol, componente majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. como foi constatado na análise cromatográfica realizada nesse estudo (72,6%).

No espectro da maltodextrina foi possível visualizar uma banda em 3309 cm^{-1} atribuída ao estiramento OH, na região entre $800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ atribuído ao estiramento da ligação C-O e bandas abaixo de 1000 cm^{-1} característico das vibrações de estiramento do anel de anidroglicose (CASTRO-CABADO et al., 2016).

O espectro do HPMC apresenta uma banda por volta de 3477 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento OH do anel e da cadeia lateral ν (-CH-OH) e ν (-CH₂-OH). Em 2893 e 2833 cm^{-1} são as bandas referentes à vibração de estiramento do grupo CH. Já a banda em 1622 cm^{-1} decorre da vibração de deformação do grupo OH. A banda por volta de 1373 cm^{-1} é referente a deformação do grupo CH-OH. A banda em 1057 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C-O. As bandas presentes na região abaixo de 1000 cm^{-1} são atribuídas às absorções de grupos alcoólicos (HAO et al., 2012).

Já no espectro do CMC as bandas encontradas foram: 3425 cm^{-1} referente ao estiramento O-H em ligações hidrogênio intramolecular / intermolecular; 1587 cm^{-1} identifica-se o sal COO-Na⁺. As bandas em 1420 e 1330 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O em íons COO⁻; 1055 cm^{-1} que corresponde ao estiramento e deformação C-OH, 1022 cm^{-1} deformação OH em ligação glicosídica; e 900 cm^{-1} referente à deformação angular C-H (ZALESKA et al., 2002; TONG et al., 2008; YUEN et al., 2009).

O espectro de FTIR do LSS apresentou bandas correspondentes à deformação axial simétrica de CH₃ e assimétrica de CH₂ em 2849 cm^{-1} e 2916 cm^{-1} , respectivamente. As bandas em 1468 cm^{-1} e 2955 cm^{-1} , correspondentes às deformações angular e axial de ligação C-H, respectivamente, característico de hidrocarbonetos. A banda em 1082 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial do sistema S-O-C e a banda em 1217 cm^{-1} a uma deformação axial do grupo S=O (FIGUEIREDO, 2012).

No espectro da micropartícula, para as bandas de O-H e C-O foram observados deslocamentos para maiores comprimentos de onda comparados com a maltodextrina, estes dados corroboram com os resultados térmicos que evidenciaram interações físicas durante o processo de obtenção do microparticulado com os outros componentes. Tal fato pode ser explicado pelas ligações de hidrogênio dos grupos O-H e C-O entre os excipientes utilizados no microparticulado. Resultado semelhante foi encontrado por Castro-Cabado e colaboradores (2016) quando trabalharam com reticulação térmica de maltodextrina com ácido cítrico, no qual foi possível observar interações entre o grupo hidroxila da maltodextrina e o grupo carboxila do ácido cítrico, essas interações poderiam ser atribuídas a interações de ligações de hidrogênio (JIUGAO et al., 2005). Esse resultado é relevante, pois pode contribuir para melhorar as propriedades da rede polimérica pelo adicional de interações de ligações de hidrogênio com as cadeias de polissacarídeos (CASTRO-CABADO et al., 2016).

9.2.4 Atividade antimicrobiana da micropartícula

9.2.4.1 Ensaio de difusão em ágar

Pelo método de difusão em poços, foram testadas as micropartículas solubilizadas em Tween 80® a 2,5, 5 e 10%, em uma mistura de 1:1 de Tween 80® a 5% e DMSO a 10%, apenas DMSO a 5 e 10%, LSS 0,5, 1,0, 1,5 e 2% e Cremophor® RH40 frente aos microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, sendo usado como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina 0,12% e como controle negativo o Tween® 80 5%. Após o período de incubação de 24h para as bactérias e 48h para o fungo, foi verificada a formação dos halos de inibição e realizada a medição, porém só foram visualizados os halos formados pelo controle positivo.

No método de difusão em ágar, as propriedades físico-químicas do produto testado e do meio de cultura interferem no processo de difusão e a ausência da formação de halos de inibição de crescimento microbiano pode não estar relacionada com a ausência de atividade antimicrobiana. Além disso, outros fatores podem influenciar a variação da atividade do produto testado, como a concentração final dos ativos e a proporção dos

excipientes poliméricos, que podem modular a dissolução e a solubilidade em função da concentração do OELS, no qual a variação do coeficiente de partição no meio testado pode limitar a atividade dos ativos do OELS presente na micropartícula na inibição do microrganismo testado.

9.3 Conclusão

A partir dos estudos para a preparação da emulsão para a microencapsulação foi definido que o LSS seria o tensoativo usado e que a CMC seria necessária para uma melhor estabilidade da emulsão. O HPMC foi adicionado e através de um planejamento fatorial foram obtidas 9 amostras em diferentes condições experimentais que após submetidas ao processo de liofilização foram analisadas por CG-DIC, sendo possível distinguir dentre as amostras as melhores condições de preparo do sistema microparticulado contendo OELS a partir da recuperação do timol. A amostra na condição experimental 1 que corresponde a proporção 1:10 (OELS:MD), 250 mg de HPMC e 50 mg de LSS, foi a que apresentou maior porcentagem de recuperação de timol após o processo de extração e doseamento. A análise estatística dos resultados experimentais mostrou que a adição do HPMC foi a única variável significativa para percentual de recuperação de timol. Avaliando os resultados da recuperação de timol observamos que as micropartículas desenvolvidas poderiam ser submetidas aos estudos para verificação das atividades antibacteriana e antifúngica, porém a avaliação da atividade microbiológica do microparticulado obtido pelo método de difusão em poços não evidenciou atividade, necessitando que seja realizado outros ensaios por métodos diferentes ou ainda reavaliado as possíveis interações do óleo com os excipientes presentes no microparticulado que possam estar impedindo a liberação do timol. O microparticulado desenvolvido contendo o OELS poderia ser usado como produto intermediário para incorporação em diversas formas farmacêuticas com o intuito de proteger a substância ativa contra a umidade, luz e calor, conferindo maior estabilidade além de evitar a volatilização, mascarar odor e sabor e controlar a liberação do ativo.

REFERÊNCIAS

ABE, S., SATO, Y., INUOE, S., ISHIBASHI, H., MARUYAMA, N., TAKIZAWA, T., OSHIMA, H., YAMAGUCHI, H. Anti-candida albicans activity of essential oils including essential oils from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its components, citral. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 44, n. 4, p. 285-291, 2003.

ADESEGUN A. S., SAMUEL, F. O., OLAWALE, R. G., FUNMILOLA, S. A. Antioxidant activity of the volatile oil of *Cymbopogon citratus* and its inhibition of the partially purified and characterized extracellular protease of *Shigella sonnei*. **American journal of research communication**, v. 1, n. 1, p. 31-45, 2013.

AGGARWAL, H., SINGH, M. P., NAHAR, P., MATHUR, H., GV, S. Efficacy of Low-Level Laser Therapy in Treatment of Recurrent Aphthous Ulcers – A sham controlled split mouth follow up study. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 8, n. 2, 218–221, 2014.

AGRA, M. F., FREITAS, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, A. C. L. Ensaio clínico randomizado para avaliar a eficácia clínica da *Lippia sidoides* Cham. na prevenção e tratamento da mucosite. 2010. Tese (Doutorado em Odontologia – Diagnóstico Bucal) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

AL-DASOOQI, N., SONIS, S. T., BOWEN, J. M., et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. **Support Care Cancer**. v. 21, p. 2075- 2083, 2013.

ALLEN JÚNIOR, L. V., POPOVICH, N. G. ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas E Sistemas De Liberação De Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus. 1993.

ALMEIDA, L. M. A. G. **Aplicações otorrinolaringológicas do Xilitol**. IV Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO. Guarulhos, 2006.

ALMEIDA, M. C. S., ALVES, L. A., SOUZA, L. G. S., MACHADO, L. L., MATOS, M. C., OLIVEIRA, M. C. F., LEMOS, T. L. G., BRAZ-FILHO, R. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Quím. Nova**, v. 33, n.9, 2010.

ALVARENGA, A. L., SCHWAN, R. F., DIAS, D. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., BRAVO-MARTINS, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ALVIANO, W. S., MENDONCA, R. R., ALVIANO, D. S., BIZZO, H. R., SOUTO-PADRÓN, T., RODRIGUES, M. L., BOLOGNESE, A. M., ALVIANO, C. S., SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral microbiology and immunology**, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.

AL-YOUSEF, S. A. Antifungal activity of volatiles from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*[J]. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 2, n. 6, p. 261-272, 2013.

AMANLOU, M., BABAEI, N., SAHEB-JAMEE, M., SALEHINIA, A., FARSAM, H., TOHIDAST, Z. Efficacy of *Satureja khuzistanica* extract and its essential oil preparations in the management of recurrent aphthous stomatitis. **DARU**, v. 15, p. 231-235, 2007.

ANNIE, D., CHANDRAMOULI, V., ANTHONYSAMY, S., GHOSH, C., DIVAKAR, R. Freeze drying vs microwave drying - methods for synthesis of sinteractive thorium powders. **Journal of Nuclear Materials**, v. 484, p. 51-58, 2017.

APPEL, G., RÉUS, M. **Formulações Aplicadas à Odontologia**. 2. ed., RCN Editora, São Paulo, 2005. 607 p.

AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos de técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

ARGENTA S. C., ARGENTA L. C., GIACOMELLI S. R., CEZAROTTO V. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**. v. 7, n. 12, p.51-60, 2011. Artmed, p. 504-536, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAGLEY, D. M., WATERS, D., KONG, B. M. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 1155-60, 1994.

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.

BAR, A., **Xylitol**. In: O'Brein Nabors, L, Gelardi RC. Alternative Sweeteners. 2. ed., New York: Marcel Dekker Inc. 1991, p. 349-379.

BARRONS, R. W. Treatment strategies for recurrent oral aphthous ulcers. **American journal of health-system pharmacy**, v. 58, p. 41-50, 2001.

BARROS-NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Campinas: São Paulo, 413p., 2010.

BASCONES-MARTINEZ, A., FIGUERO-RUIZ, E., ESPARZA-GOMEZ, G. C. [Oral ulcers]. **Medicina Clinica (Barcelona)**, v. 125, n. 15, p. 590-7, 2005.

BAUER, A. W., KIRBY, W. N., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BELATO, K. K., de OLIVEIRA, J. R., de OLIVEIRA, F. S., de OLIVEIRA, L. D., CAMARGO, S. E. A. Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264.7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans*. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 455–460, 2018.

BENSINGER, W., SCHUBERT, M., ANG, K., BRIZEL, D., BROWN, E., EILERS, J. G., et al. NCCN Task Force Report: Prevention and Management of Mucositis in Cancer Care. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 6, n. 1, 2008.

BONAN, P. R. F. et al. Aspectos clínicos, biológicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 235-242, 2005.

BONAN, P. R. F., PIRES, F. R., LOPES, M. A., Di HIPÓLITO JR, O. Evaluation of salivary flow in patients during head and neck radiotherapy. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 156-160, 2003.

BORGES, A. R., AIRES, J. R., HIGINO, T. M., MEDEIROS, M. D. de, CITÓ, A. M., LOPES, J. A., FIGUEIREDO, R. C. de. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012.

BOTELHO, M. A., RUELA, R. S., MONTENEGRO, D., COSTA, J. G. M., SANTOS, J. A., FRANÇA, M. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical Biology Researchon Line**, v.40, n.3, p.349-356, 2007a.

BOTELHO, M. A., SANTOS, R. A., MARTINS, J. G., CARVALHO, C. O., PAZ, M. C., AZENHA, C. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research**, v.23, n.9, p.1214-1219, 2009.

BOTELHO, M. A., BEZERRA FILHO, J. G., CORREA, L. L., CRUZ, F. S. G., MONTENEGRO, D., GAPSKI, R., CASTRO, B. G. A., HEUKELBACH, J. Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: A double-blinded randomized controlled trial. **Journal of Applied Oral Science**, v.15, n.3, p.175-180, 2007b.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 4, 13 de junho de 2014. **Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** Brasília, DF, 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **“Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos.”**, 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS.** Espécies vegetais. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Manual de Condutas para Úlcera Neutróficas e Traumáticas.** Brasília. 2.ed., 2002. 55p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie Lippia sidoides (Alecrim-pimenta).** - Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial Nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. **Aprova a Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** - Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 971, de 3 de maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** - Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 junho 2006b. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : Lippia sidoides Cham., Verbenaceae (Alecrim-pimenta)** / Ministério da Saúde,

Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 72 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P D.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, p. 129–146, 2003.

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

CANO-HIGUITA, D. M., VÉLEZ, H. A. V., TELIS, V. R. N. Microencapsulation of oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 2, p. 173–182, 2015.

CARVALHO, R. B. F. de, ALMEIDA, A. A. C. de, FREITAS, R. M. de, LIMA, L. S., DAVID, J. P., DAVID, J. M., FEITOSA, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon*. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1375-1379, 2013.

CASTANO, A., LECHON, M. J. G. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literatura survey. **Toxicology In Vitro**, v. 19, p. 695-705, 2005.

CASTELO, A. V. M., Del MENEZZI, C. H. S., RESCK, I. S., Rendimento e Análises Espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}H ; IV) da Composição Química dos Óleos Essenciais de Quatro Plantas do Cerrado. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CASTRO-CABADO, M., PARRA-RUIZ, F. J., CASADO, A. L., ROMÁN, J. S. Thermal crosslinking of maltodextrin and citric acid. methodology to control the polycondensation reaction under processing conditions. **Polymers and Polymer Composites**, v. 24 n. 8, p. 643-654, 2016.

CAUFIELD, P. W., DASANAYAKE, A. P., LI, Y., PAN, Y., HSU, J., HARDIN, J. M. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4018-4023, 2000.

CAVALCANTI, E. S. B., MORAIS, S. M., LIMA, M. A. A., SANTANA, E. W. P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H., NICULAU, E. S., BLANK, A. F., CÂMARA, C. A., ARAÚJO, I. N., ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 829–832, 2010.

CAVALCANTI, Y. W., PÉREZ, A. L. A. de L., XAVIER, G. D. R., de ALMEIDA, L. de F. D., PADILHA, W. W. N. Antifungal Activity of Brazilian Plant Extracts Against Candida Strains. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, p. 43-48, 2012.

CAWLEY, M. M., BENSON, L. M. Current Trends in Managing Oral Mucositis. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 9, n. 5, p. 584–92, 2005.

COLLINS, C. H. **Microbiological Methods**. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., London, 1964, 330 p.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA RESOLUÇÃO CFO-82/2008. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal.

CORTEZ, L. E. R., CORTEZ, D. A. G., FERREIRA, A. G., VIEIRA, P. C., SILVA, M. F. das G. F. da, FERNANDES, J. B. Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 164-169, 2006.

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

COSTA, S. M. O., LEMOS, T. L. G., PESSOA, O. D. L., ASSUNÇÃO, J. C. C., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 66, 2002.

COSTA, S.M.O., LEMOS, T.L., PESSOA, O.D., PESSOA, C., MONTENEGRO, R.C., BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 792–795, 2001.

DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39–44, 2003.

DANTAS, B. B., FAHEINA-MARTINS, G. V., COULIDIATI, T. H., BOMFIM, C. C. B., DIAS, C. da S., BARBOSA-FILHO, J. M., ARAÚJO, D. A. M. Effects of curine in HL-60 leukemic cells: cell cycle arrest and apoptosis induction. **Journal of natural medicines**, v. 69, n. 2, p. 218–223, 2015.

DENHAM, J. W., HAUER-JENSEN, M. The radiotherapeutic injury- a complex 'wound'. **Radiotherapy and Oncology**, v. 63, n. 2, p. 129–145, 2002.

DI PASQUA, R., HOSKINS, N., BETTS, G., MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745–2749, 2006.

DOMINGO, D., LÓPEZ-BREA, M. Plantas com acción antimicrobiana. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385–393, 2003.

DÖRR, W., HAMILTON, C. S., BOYD, T., REED, B., DENHAM, J. W. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 52, n. 4, p. 911–917, 2001.

DOUGHERTY PF, YOTTER DW, MATTHEWS TR. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 2, p. 225–228, 1977.

EDGAR, N. R., SALEH, D., MILLER, R. A. Recurrent Aphthous Stomatitis: a review. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 10, n. 3, 2017.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.

EKPENYONG, C. E., AKPAN E., NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p. 321–337, 2015.

ELSHIKH, M., AHMED, S., FUNSTON, S., DUNLOP, P., MCGAW, M., MARCHANT, R., BANAT, I., M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology letters**, v. 38, p.1015-1019, 2016.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 1996. 14th ed., WB Saunders Company: London, cap. 7.

FABRI, R. L., NOGUEIRA, M. S., MOREIRA, J. R., BOUZADA, M. L., SCIO, E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7-8, p. 840-846, 2011.

FADDA, G., CAMPUS, G., LUGLIÈ P. Risk factors for oral mucositis in paediatric oncology patients receiving alkylant chemotherapy. **BMC Oral Health**, v. 6, n. 13, 2006.

FANDOHAN, P., GNONLONFIN, B., LALEYE, A., GBENOU, J. D., DARBOUX, R., MOUDACHIROU, M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2493–7, 2008.

FARIAS N. M. P., LIMA, E. O., 2000. **Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero Candida: uma alternativa no controle da infecção hospitalar**. In: Prêmio Jovem Cientista XVI, Edição saúde da população, Controle da infecção hospitalar. Porto Alegre: Fundação Roberto Marinho, p. 91-120.

- FAVARO-TRINDADE, C. S., PINHO, S. C. de, ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.
- FERNANDES, L. P., CANDIDO, R. C., OLIVEIRA, W. P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 425–432, 2012.
- FENNER, R., BETTI, A. H., MENTZ, L. A., RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006.
- FERHAT, M. A., MEKLATI, B. Y., CHEMAT, F. Comparison of different isolation methods of essential oils from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. **Flavour and fragrance journal**, v. 22, p. 494-504, 2007.
- FERRARI, S. L. P., CRIBARI NETO, F. Beta Regression for Modelling Rates and Proportions. **Journal of Applied Statistics**, Inglaterra, v. 31, n.7, p. 799-815, 2004.
- FERREIRA, T. M., SILVA, F. S., TEODORO, G. R., COSTA, A. C. B. P., MARIA, A., BELTRAME JÚNIOR, M., KHOURI, S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 118-25, 2009.
- FIGUEIREDO, L. S., BONFIM, F. P. G., SIQUEIRA, C. S., FONSECA, M. M., SILVA, A. H., MARTINS, E. R. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 154-158, 2009.
- FIGUEIREDO, L. P. Análise de excipientes em comprimidos de fármacos comercializados. 2012. 168p. Mestrado (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, Universidade Federal do ABC, Santo André.
- FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUZA, I. M. L., RODRIGUES, R. A. F. 2006. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar; Multiciência construindo a história dos produtos naturais**, 07 de outubro de. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm. Acesso outubro de 2018.
- FONSECA, M.C.M., CASALI, V.W.D., BARBOSA, L.C.A. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couvecravinho

(*Porophyllumruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 75-79, 2007.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill.e de seus principais constituintes contra dermatófito e *Candida* spp. isolados de cães.** 2008. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; MASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FRANCISCO, K. S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v.4, n. 1, p. 18 - 24, 2010.

FU, J., WEI, P., ZHAO, C., HE, C., YAN, Z., HUA, H. In vitro antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. **Oral Diseases**, v. 20, p. 815–820, 2014.

FU, Y., ZU, Y., CHEN, L., SHI, X., WANG, Z., SUN, S., EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21,p. 989-994, 2007.

GANZERA, M., STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—Anupdate covering 2011–2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 211–233, 2018.

GARDNER, Z. E., MCGUFFIN, M. **American Herbal Products Association's botanical safety handbook.** 2nd ed. CRC Press, American Herbal Products Association, Boca Raton, 2013.

GAUTAM, A. P., FERNANDES, D. J., VIDYASAGAR, M. S., MAIYA, A. G., GUDDATTU, V. Low level laser therapy against radiation induced oral mucositis in elderly head and neck cancer patients- a randomized placebo controlled trial. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 51-56, 2015.

GEORGIU, M, PATAPATIOU, G, DOMOXOUDIS, S., PISTEVOU-GOMPAKI, K., PAPANIKOLAOU, A. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 215–6, 2012.

GHALAYANI, P., ZOLFAGHARY, B., FARHAD, A. R., TAVANGAR, A., SOLEYMANI B. The efficacy of Punicagranatum extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. **Journal of research in pharmacy practice**, v. 2, p. 88–92, 2013.

GHARECHAH, M., MOOSAVI, H., FORGHANI, M. Effect of Surface Roughness and Materials Composition on Biofilm Formation. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 541-546, 2012.

GIRÃO, V. C. C., NUNES-PINHEIRO, D. C., MORAIS, S. M., SEQUEIRA, J. L., GIOSSO, M. A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 95-102, 2003.

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

GONÇALVES, N. C. L. A. V., VALSECKI JUNIOR, A., SALVADOR, S. L. S., BERGAMO, G. C. Efeito de soluções fluoretadas contendo xilitol e sorbitol no número de estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 9, n.1, p. 30-34, 2001.

GOUIN, S. Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GRANATO, D., NUNES, D. S. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle da Qualidade de Alimentos e Bebidas**. 1ed. Rio de Janeiro, 2016, p.576.

GUINOISEAU, E., LUCIANI, A., ROSSI, P. G., QUILICHINI, Y., TERNENGO, S., BRADESI, P., BERTI, L. Cellular effects induced by Inula graveolens and Santolina corsica essential oils on Staphylococcus aureus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.29, n.7, p. 873-9, 2010.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HAJIMAHMOODI, M., MOGHADDAM, G., MOUSAVI, S. M., SADEGHI, N., OVEISI, M. R., JANNAT, B. Total Antioxidant Activity, and Hesperidin, Diosmin, Eriocitrin and Quercetin Contents of Various Lemon Juices. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 6, p. 951-956, 2014.

HANDSCHEL, J., SUNDERKÖTTER, C., PROTT, F. J., MEYER, U., KRUSE-LÖSLER, B., JOOS, U. Increase of RM 3/1- positive macrophages in radiation induced oral mucositis. **The Journal of Pathology**, v. 193, n. 2, p. 242-247, 2001.

HAO, Y., PENG, J., AO, Y., LI, J., ZHAI, M. Radiation effects on microcrystalline cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1629-1633, 2012.

HEYDARPOUR, F., ABASABADI, M., SHAHPURI, Z., VAZIRI, S., NAZARI, H. A., NAJAFI, F., MIRZAEI, M., FARZAEI, M. H. Medicinal plant and their bioactive phytochemicals in the treatment of recurrent aphthous ulcers: A review of clinical trials. **Pharmacognosy reviews**, v. 12, n. 23, p. 27-39, 2018.

JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E., HE, Y., BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

JIUGAO, Y., NING, W., XIAOFEI, M. The effects of citric acid on the properties of thermoplastic starch plasticized by glycerol. **Starch-Stärke**, v. 57, n. 10, p. 494-504, 2005.

JUNG, H. J., AHN, H. I., PARK, J. Y., HO, M. J., LEE, D. R., CHO, H. R., PARK, J. S., CHOI, Y. S., KANG, M. J. International Journal of Biological Macromolecules Improved oral absorption of tacrolimus by a solid dispersion with hypromellose and sodium lauryl sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 282-287, 2016.

KANAKDANDE, D., BHOSALE, R., SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 536-541, 2007.

KELNER, N., CASTRO, J. F. L. de. Low-energy laser in the management of radiation-induced oral mucositis: report of two cases. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2007.

KIGNEL, S. **Estomatologia: Bases do Diagnóstico para o Clínico Geral**. São Paulo: Santos, 2007.

KÖSTLER, W. J., HEJNA, M., WENZEL, C., ZIELINSKI, C. C. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 51, n. 5, p. 290-315, 2001.

KUMARI, S., SARMAH, N., HANDIQUE, A. K. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Ripen and Unripe Juice of Citrus limon. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 6, p. 18-20, 2014.

LACOSTE, E., CHAUMONT, J. P., MANDIN, D. Antiseptic properties of essential oil of Lippia sidoides Cham. application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 54, p. 228-230, 1996.

LALABONOVA, H., DASKALOV, H. Clinical assessment of the therapeutic effect of low-level laser therapy on chronic recurrent aphthous stomatitis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 929-933, 2014.

LALLA, R. V., BOWEN, J., BARASCH, A., ELTING, L., EPSTEIN, J., KEEFE, D. M., et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-61, 2014.

LALLA, R. V. P. D. Treatment of mucositis including new medications.pdf. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 5, p. 348-354, 2006.

LALLA, R. V., SONIS, S. T., PETERSON, D. E. Management of Oral Mucositis in Patients who have Cancer. **Dental Clinics of North America**, v. 52, p. 61-77, 2008.

LEMOS, T.L.J.et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from brazilian plants. **Fitoterapia**, v.63, p.266-8, 1992.

LEMOS, T. L. G., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., CLARK, A. M., MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of

Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 82–84, 1990.

LEMOS, T. L. G., MONTE, F. J. Q., SANTOS, A. K. L., FONSECA, A. M., SANTOS, H. S., OLIVEIRA, M. F. Quinones from plants of northeastern Brazil: Structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. **Natural Product Research**, v. 21, n. 6, p. 529-50, 2007.

LIMA, I. O., OLIVEIRA, R, A. G., LIMA, E. O., FARIAS, N. M. P., SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, M., MOTTA, M. E., ALVES, G. **Saúde da criança: para entender o normal**. Editora Universitária UFPE, Recife, 2007.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G., MORAIS, J. C., CARVALHO, S. M., RODRIGUES, V. A., GUIMARÃES, L. G. F. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência & Agrotecnologia**. v. 35, p. 664-671, 2011.

LIONEL, D, CHRISTOPHE, L., MARC, A., JEAN-LUC, C. Oral mucositis induced by anticancer treatments: physiopathology and treatments. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 2, p.159–68, 2006.

LORENTE, J., VEGARA, S., MARTÍ, N., IBARZ, A., COLL, L., HERNÁNDEZ, J., VALERO, M., SAURA, D. Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. **Food chemistry**, v. 162, p. 186-191, 2014.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512 p. 2002.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 1 ed. Williams & Wilkins, London 1980.

LOTA, M-L, SERRA, D. de R., TOMI, F., JACQUEMOND, C., CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 796-805, 2002.

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

MADDOCKS-JENNINGS, W., WILKINSON, J. M., CAVANAGH, H. M., SHILLINGTON, D. Evaluating the effects of the essential oils *Leptospermum scoparium* (manuka) and *Kunzea ericoides* (kanuka) on radiotherapy induced mucositis: A randomized, placebo controlled feasibility study. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 13, p. 87–93, 2009.

MARASINI, N., TRAN, T. H., POUDEL, B. K., CHO, H. J., CHOI, Y. K., CHI, S-C., CHOI, H-G, YONG, C. S., KIM, J. O. Fabrication and evaluation of pH-modulated solid dispersion for telmisartan by spray-drying technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 424–432, 2013.

MARQUES, M. B., BROOKINGS, E. S., MOSER, S. A., SONKE, P. B., WAITES, K. B. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.5, p. 881-885, 1997.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

MARSH, P. D. Contemporary perspective on plaque control. **British Dental Journal**, v. 212, n. 12, p. 601-606, 2012.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D. C., EVANGELISTA, D. J., 2002. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220p.

MARTINS, E. R., SANTOS, R. H. S. **Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 26 p. 1995.

MARTINS, I. M. D. **Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production, Characterization and Release Evaluation**. 2012. Dissertação de Mestrado (Doctor of Philosophy in Chemical and Biological Engineering). Universidade do Porto, Porto, 2012.

MATOS, E. H. S. F. **Cultivo do limão**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 2007.

MATOS, F. J. A., OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia (in Portuguese). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 70, p. 84–87, 1998.

MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imp. Universitária, UFC, 2000. 344 p.

MATTÉ, G. M., da ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana, **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206–218, 2013.

MATTOS, J. K. A. **Plantas medicinais: aspectos agronômicos**. Brasília: Edição do autor. 1996. 51 p.

MEDEIROS, M. D. de, SILVA A. C. da, CITÓ, A. M., BORGES, A. R., LIMA, S. G. de, LOPES, J. A., FIGUEIREDO, R. C. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **International Journal for Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 237-41, 2011a.

MEDEIROS, M. G. C. **Contribuições tecnológicas para formas farmacêuticas a partir de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Lippia origanoides* H.B.K. para tratamento das leishmanioses**. Tese [Doutorado em Biotecnologia] - Universidade Estadual do Ceará, 2011b.

MEILLER, T. F., KUTCHER, M. J., OVERHOLSER, C. D., NIEHAUS, C., DEPAOLA, L. G., SIEGEL, M. A. Effect of an antimicrobial mouthrinse on recurrent aphthous ulcerations. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 72, n. 4, p. 425-429, 1991.

MELO, M. T. P de, RIBEIRO, J. M., MEIRA, M. R., FIGUEIREDO, L. S. de, MARTINS, E. R. Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita Ciência Rural, **Santa Maria**, v.41, n.7, p.1166-1169, 2011.

MILGROM, P., LY, K. A., TUT, O. K., MANCL, L., ROBERTS, M. C., BRIAND, K., GANCIO, M. J. Xylitol Pediatric Topical Oral Syrup to Prevent Dental Caries A

Double-blind Randomized Clinical Trial of Efficacy. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 163, n. 7, p. 601-607, 2009.

MORAIS, A. R. D. V., ALENCAR, E. D. N., XAVIER JÚNIOR, F. H., OLIVEIRA, C. M. de, MARCELINO, H. R., BARRATT, G., FESSI, H., EGITO, E. S. T. do, ELAISSARI, A. Freeze-drying of emulsified systems: A review. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 503, p. 102–114, 2016.

MORAIS, L. A. S. de, CHAVES, F. C. M., GONÇALVES, G. G., CASTANHA, R. F., BARBOSA JÚNIOR, A. P., AZEVEDO, I. M. G. **Composição química e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) submetido a dois tipos de extração**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 5., 2009, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2009 b. 1 CD-ROM.

MORAIS, L.A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, S. R. de , OLIVEIRA, T. L. S., BARA, M. T. F., CONCEIÇÃO, E. C. da, REZENDE, M. H., FERRI, P. H., PAULA, J. R. de. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves grown in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, 2012.

MOTA, M. L. **Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE em modelo murino - *Plasmodium berghei***. 2009. Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MUSSATO, S. I., ROBERTO, I. C. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 4, 2002.

NAIK, M. I., FOMDA, B. A., JAYKUMAR, E., BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.

NASCIMENTO, G. G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C., SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1-15, 2000.

NASCIMENTO, I. B., INNECCO, R., MATOS, S. H., BORGES, N. S. S., MARCO, C. A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de *Óleoessencial de*

capim santo (*Andropogum sp.*) **Revista Caatinga**, v. 19, p. 123-127, 2006.

NASRY, S. A., EL SHENAWY, H. M., MOSTAFA, D., AMMAR, N. M. Different modalities for treatment of recurrent aphthous stomatitis. A randomized clinical trial. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 8, n. 5, p. 517-22, 2016.

NCCLS, 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002, **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NIEDDU, M., RASSU, G., BOATTO, G., BOSI, P., TREVISI, P., GIUNCHEDI, P.; CARTA, A., GAVINI, E. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 393–399, 2014.

NIKOLIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., FERREIRA, I. C. F. R., CALHELHA, R. C., FERNANDES, Â., MARKOVIĆ, T., MARKOVIĆ, D., GIWELI, A., SOKOVIĆ, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidante and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. And Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

OLIVEIRA, C. E. de, STAMFORD, T. L., GOMES NETO, N. J., SOUZA, E. L. de. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 312–316, 2010.

OLIVEIRA, F. Q., GOBIRA, B., GUIMARÃES, C., BATISTA, J., BARRETO, M., SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007a.

OLIVEIRA, G. P. de. *Libidibia ferrea* L.: Avaliação in vitro da ação antimicrobiana e citotoxicidade de extratos e de uma formulação em orabase. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

OLIVEIRA, L. C. B. S. de, CARNEIRO, P. P. M., FISCHER, R. G., TINOCO, E. M. B. A Presença de Patógenos Respiratórios no Biofilme Bucal de Pacientes com Pneumonia Nosocomial. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, 2007b.

OLIVEIRA, M. dos S., DORS, G. C., SOARES, L. A. de S., FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p.267-275, 2007c.

OLIVEIRA, M. L. M., BEZERRA, B. M. O., LEITE, L. O., GIRÃO, V. C. C., NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham.essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 283-289, 2014.

ONAWUNMI, G. O., YESIAK, W. A. B., ONGULANA, E. O. Antibacterial constituent in the essential oil of *Cymbopogon citratus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

ORTIZ, R. S., MARRERO, G. V., NAVARRO, A. L. T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 7, p. 89-95, 2002.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OTON-LEITE, A. F. et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers in surgery and medicine**, v. 47, n. 4, p. 296-305, 2015.

PARKHILL, A. L. Oral Mucositis and Stomatitis Associated with Conventional and Targeted Anticancer Therapy. **Journal of Pharmacovigilance**, v. 1, n. 3, p. 4-7, 2013.

PASCUAL, M. E., SLOWING, K., CARRETERO, E., MATA, D.S., VILLAR, A. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 201, 2001.

PAULA, V. A., MODESTO, A., SANTOS, K. R., GLEISER, R. Antimicrobial effects of the combination of chlorhexidine and xylitol. **British Dental Journal**, v. 209, p. E19, 2010.

PAULA, H. C., SOMBRA, F. M., FREITAS CAVALCANTE, R., ABREU, F. O., PAULA, R. C. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering**, v. 31, n. 2, p. 173-178, 2011.

PENIDO, A. B., SILVA, M. W. B. **Guia Fitoterápico**, Facimp, p. 11-14, p. 59-65, 2007.

PERAZZO, M. de F., COSTA NETA, M. C. da, CAVALCANTI, Y. W., XAVIER A. F. C., CAVALCANTI, A. L. Efeito Antimicrobiano do Óleo Essencial do *Cymbopogon citratus* Sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. Antimicrobial Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil on Dental Biofilm-Forming Bacteria. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 553-558, 2012.

PEREIRA, A. de F. F., SILVA, T. C. da, CALDANA, M. de L., MACHADO, M. A. de A. M., BUZALAF, M. A. R. Revisão de Literatura: utilização do xilitol para prevenção da otite média aguda. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 87-92, 2009.

PEREIRA, S. S. T. C. **Medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais industrializados e oficializados pelo Ministério da Saúde no Brasil: regulamentação sanitária, abrangência e qualidade dos estudos pré-clínicos e clínicos**. 2013. 344p. Tese de doutorado -Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

PETERSEN, P. J., LABTHAVIKUL, P., JONES, C. H., BRADFORD, P. A. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 573-576, 2006.

PETERSON, D. E., BENSADOUN, R. J., ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 6, p. vi78–84, 2011.

PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 p.

PLEVOVÁ, P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy- induced oral mucositis: a review. **Oral Oncology**, v. 35, n. 5, p. 453-470, 1999.

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

RAND, K. H., HOUCK, H. J., BROWN, P., D BENNETT D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 613-615, 1993.

RAO, N. R., NAGARUJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 331-337, 2003.

RÉ, M. I. Microencapsulation by *spray drying*. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J., RICHARD C. J. **Oral Pathology – Clinical Pathologic Correlations**. W. B. Saunders Company: Philadelphia. 2008. pp. 143-152.

REIS, F. B. **Bioconservação de pescado (surubim - *Pseudoplatystoma* sp.) com utilização da bactéria láctica bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).**2010. Dissertação [Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia] - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

REZENDE, H. A., COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771– 780, 2004.

RUBENSTEIN, E. B., PETERSON, D. E., SCHUBERT, M., KEEFE, D., McGUIRE, D., EPSTEIN, J., ELTING, L. S., FOX, P. C., COOKSLEY, C., SONIS, S. T. Clinical

practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, n. 9, p. 2026–46, 2004.

SÁ, C. G., CARDOSO, K. M. F., FREITAS, R. M., Feitosa, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 211-215, 2012.

SAMPAIO, F.C., PEREIRA, M.S.V., DIAS, C.S., COSTA, V.C.O., CONDE, N.C.O., BUZALAF, M.A. R. In vivo antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289-294, 2009.

SANDHU, D. S., HEINRICH, M. The use of health foods, spices and other botanicals in the Sikh community in London. **Phytotherapy research**, v.19, n. 7, p. 633-642, 2005.

SANTOS, F. J. B., LOPES, J. A. D., CITO, A. M. G. L., OLIVEIRA, E. H., LIMA, S. G., REIS, F. D. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 504-506, 2004.

SANTOS, R. O. **Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro**. 2005. Dissertação [Mestrado em Ciências Veterinárias] - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

SANTOS, S. C., COSTA, W. F., BATISTA, F., SANTOS, L. R., FERRI, P. H., FERREIRA, H. D., SERAPHIN, J. C. Variação sazonal dos teores de taninos em cascas de espécies de barbatimão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.

SANTOS, T. R. J., SANTANA, L. C. L. A. **Teor de carotenoides totais e potencial antimicrobiano de cascas de limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm.) submetidas a diferentes temperaturas de secagem**. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X CIGR Section e VI International Technical Symposium, 2016, Gramado-RS. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X CIGR Section e VI International Technical Symposium, 2016.

SCHIAR, V. P. P., SANTOS, D. B., LUDTKE, D. S., VARGAS, F., PAIXÃO, M.W., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 139-145, 2007.

SCULLY, C., EPSTEIN, J. B. Oral health for the cancer patient. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 32B, p. 281-292, 1996.

SCULLY, C., FELIX, D. H. Oral Medicine--Update For The Dental Practitioner. Aphthous and other common ulcers. **British Dental Journal**, v. 199, n. 5, p. 259-64, 2005.

SCULLY, C., GORSKY, M., LOZADA-NUR, F. Aphthous ulcerations. **Dermatologic Therapy**, v. 15, p. 185-205, 2002.

SCULLY, C., PORTER, S. ABC of Oral Health. Oral Cancer. **The BMJ**, v. 321, n. 7253, p. 97-100, 2000.

SCULLY, C., PORTER, S. Oral Cancer. **Western Journal of Medicine**, v. 174, n. 5, p. 348-351, 2001.

SELLAR, W. **Óleos que curam: o poder da aromaterapia**. Rio de Janeiro: Record/Nova Era, 2002.

SERRANO, M. C., PAGANI, R., VALLET-REGÍ, M., PEÑA, J., RÁMILA, A., IZQUIERDO, I., PORTOLÉS, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly (ε caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603 - 5611, 2004.

SILVA, F., FERREIRA, S., QUEIROZ, J. A., DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1479-86, 2011.

SILVA, F., SANTOS, R.H.S., DINIZ, E.R., BARBOSA, L.C.A., CASALI, V.W.D., LIMA, R. R. Teor e composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 33-38, 2003.

SILVEIRA, K. G. Avaliação de tolerância e segurança de espuma contendo óleos essenciais com potencial para prevenção e tratamento da mucosite oral – estudo de fase I. 2018. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SILVEIRA, P. F., BANDEIRA, M. A. M., ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e aos fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2006.

SIMÕES, C. M. O., SHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC: Florianópolis, 2003, 247 p.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1102p. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIMÕES, M., BENNETT, R. N. ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Report**, v.26, n.6, p. 746-57, 2009.

SINGH, P., MEDRONHO, B., ALVES, L., SILVA, G. J. da, MIGUEL, M. G., LINDMAN, B. Development of Carboxymethyl Cellulose- Chitosan Hybrid Micro- and Macroparticles for Encapsulation of Probiotic Bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 87-95, 2017.

SIQUI, A.C., SAMPAIO, A.L.F., SOUSA, M.C., HENRIQUES, M.G.M.O., RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p. 38-43, 2000.

SNYDERS, O., KHONDOWE, O. Oral chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill adults in the ICU: A systematic review. **Southern African Journal of Critical Care**, v. 27, n. 2, 2011.

SOLÓRZANO-SANTOS, F., MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1-6, 2011.

SONIS, S. T. Oral mucositis in cancer therapy. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 2, n. 3, p. 3-8, 2004.

SOSAN, M. B., ADEWOYIN, F. B., ADEWUNMI, C. O. Larvicidal properties of three indigenous plant oils on the mosquito *Aedes aegypti*. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 30-33, 2001.

SOUZA, J. R.P., MORAIS, H., CARAMORI, P.H., JOJANNSSON, L.A.P.S., MIRANDA, L. V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 40-44, 2008.

SOUZA, L. C. D., LOPES, F. F., BASTOS, E. G., ALVES, C. M. C. Infecção oral por *Pseudomonas aeruginosa* em paciente com doença renal crônica - um relato de caso. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 40, n. 1, 2018.

SOUZA, T. M., MOREIRA, R. R. D., PIETRO, R. C. R. L., ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade antisséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 71-75, 2007.

STEILING, W., BRACHER, M., COUTELLEMONT, P., SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 375–84, 1999.

STOKMAN, M. A., SPIJKERVET, F. K., BURLAGE, F. R., DIJKSTRA, P. U., MANSON, W. L., VRIES, E. G. de, ROODENBURG, J. L. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomized clinical trial. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 7, p. 1012-6, 2003.

STRATEVA, T., YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1133–1148, 2009.

TAIZ, L., ZEIGER, E., 2004. **Fisiologia vegetal**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed, 720.

TAVARES, E. S., JULIÃO, L. S., LOPES, D., BIZZO, H. R., LAGE, C. L. S., LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 1-5, 2005.

TONG, W., WANG, R., CHAI, D., LI, Z., PEI, F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 5, p. 454-456, 2006.

TONG, Q., XIAO, Q., LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginatecarboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v. 41, p.1007-1014, 2008.

TRAJANO, V. N. **Ação antifúngica de microcápsulas contendo óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre *Aspergillus flavus***. 2012. 106f. Tese (Doutorado). UFPB / CCS, 2012.

TRAJANO, V. N. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias sobre microorganismos contaminantes de queijo de coalho**. Dissertação (Mestrado). UFPB / CT, p.39-41, 2008.

TRONGTOKIT, Y., RONGSRIYAM, Y., KOMALAMISRA, N., APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

TROTTI, A., BELLM, L. A., EPSTEIN, J. B., FRAME, D., FUCHS, H. J., GWEDE, C. K., KOMAROFF, E., NALYSNYK, L., ZILBERBERG, M. D. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiotherapy and Oncology**, v. 66, n. 3, p. 253-262, 2003.

USA. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on the Use of Xylitol in Caries Prevention. **Oral Health Policies**, v. 33, n. 6, p. 11-12, 2010.

VALENTINI, S. R., SOMMER, W. A., MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VARGAS, A., ZEISSER-LABOUÈBE, M., LANGE, N., GURNY, R., DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1162–76, 2007.

VASCONCELOS, L. C. de, SAMPAIO, F. C., ALBUQUERQUE, A. de J. dos R., VASCONCELOS, L. C. de S. Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 277–281, 2014.

VENDRUSCOLO, G. S., RATES, S. M. K., MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais (a farmácia de Deus)**, 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. p. 165.

VINCENT, S. D., LILLY, G. E. Clinical, historic, and therapeutic features of aphthous stomatitis. Literature review and open clinical trial employing steroids. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 74, n. 1, p. 79-86, 1992.

WIJERS, O. B., LEVENDAG, P. C., HARMS, E. R., GAN-TENG, A. M., SCHMITZ, P. I., HENDRIKS, W. D., WILIMS, E. B., VAN DER EST, H., Visch LL et al. Mucositis reduction by selective elimination of oral flora in irradiated cancers of head and neck: a placebo-controlled double-blind randomized study. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 50, n. 2, p. 343-352, 2001.

YENGOPAL, V. Essential oils and interdental hygiene. **Journal of the South African Dental Association**, v. 59, p. 155-157, 2004a.

YENGOPAL, V. Essential oils: some lesser known uses and properties for improved oral health. **Journal of the South African Dental Association**, v. 59, p. 381-382, 2004b.

YENGOPAL, V. Preventative dentistry: essential oils and oral malodour. **Journal of the South African Dental Association**, v.59, p. 204-206, 2004c.

YENGOPAL, V. The use of essential oil mouthwashes as preprocedural rinses for infection control. **Journal of the South African Dental Association**, v. 59, p. 247-248, 2004d.

YUEH, M-F., TANIGUCHIB, K., CHENA, S., EVANSC, R. M., HAMMOCKD, B. D., KARINB, M., TUKEYA, R. H. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v 111, n. 48, p.17200-17205, 2014.

YUEN, S., CHOI, S., PHILLIPS, D. L., MA, C. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v.114, p. 1091-1098, 2009.

ZALESKA, H., TOMASIK, P., LI, C. Y. Formation of carboxymethyl cellulosecasein complexes by electrosynthesis. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 215-224, 2002.

ZANATTA, F.B., RÖSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, p.35-43, 2007.

ZUNT, S. L. Recurrent aphthous stomatitis. **Dermatologic Clinics**. v. 21, n. 1, p. 33-39, 2003.

ANEXOS

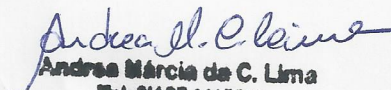


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 7ª Reunião realizada no dia 23/08/2018, o Projeto de pesquisa intitulado: **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROENCAPSULADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE L. SIDOIDES CHAM. PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MUCOSITE ORAL”**, da pesquisadora Alessandra Estevam dos Santos. Prot. nº 036/18. CAAE: 83179618.8.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do relatório final do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andrea Márcia de C. Lima
Rég. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 016386 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): ESPUMA DENTAL COM ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA SIDOIDES CHAM

Resumo: A presente invenção trata de uma espuma com atividade antimicrobiana, cicatrizante e analgésica que são propriedades presentes no óleo essencial da lippia sidóides cham, planta medicinal nativa do Brasil conhecida popularmente como alecrim-pimenta pertencente à família Verbenaceae. É usada como antisséptico pela população. Suas propriedades antimicrobianas e larvicidas estão associadas a presença de timol e carvacrol no seu óleo essencial. A atividade do óleo essencial de Lippia Sidoides Cham é relatada em estudos mostrando sua capacidade inseticida e larvicida onde é descrita a atividade antibacteriana deste óleo contra Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli.

Figura a publicar: 2

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: ALESSANDRA ESTEVAM DOS SANTOS

CPF: 00964753405

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Major Salustiano Ribeiro, 125 Ed. Sândalos, Apto 301,
Tambauzinho

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58042-090

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 514188

Fax:

Email: alessandra_estevam@hotmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: FÁBIO CORREIA SAMPAIO

CPF: 52697096434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: CCS, Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 821111

Fax:

Email: fcsampa@gmail.com.br

Inventor 3 de 4

Nome: RAIMUNDO APRÍGIO DE MENEZES JÚNIOR

CPF: 56922760387

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: CEAR - Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 297668

Fax:

Email: jrmenezes@cear.ufpb.br

Inventor 4 de 4

Nome: FABIANO VIEIRA VILHENA

CPF: 16274519866

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: Av Afonso Jose Aiello, Vilagio 2

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 17018-786

País: BRASIL

Telefone: (12) 991 291020

Fax:

Email: fabianovilhena@yahoo.com.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante de Pagamento.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenhos.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf
Acesso ao Patrimônio Genético	05_SISGEN COMPROVANTE ACESSO GENETICO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A91094C

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 22/07/2018

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Lippia sidoides

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº ABDE352

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **ABDE352**
Usuário: **FABIO SAMPAIO**
CPF/CNPJ: **526.970.964-34**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lippia sidoides
lippia para higiene bucal

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Pesquisas com oleos de Lippia sidoides**

Equipe

FABIO SAMPAIO **Universidade Federal da Paraíba**

Resultados Obtidos

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 010699 6**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2017 018692 0**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 012597 4**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 0689240**
Órgão no qual foi requerido: **INPI**
Código do requerimento: **10**
Número da patente: **BR 10 2018 012597 4**

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Teses, dissertações e revistas científicas**

Data do Cadastro: **05/11/2018 21:37:09**
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:39** de **05/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

LAUDO TÉCNICO
LIMÃO SICILIANO OE (*Citrus limon*)
 SICILIAN LEMON OIL

FABRICAÇÃO: 05/2018

VALIDADE: 05/2020

LOTE: LSJ65GTBR

CAS Number: 8008-56-8

TESTE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
ASPECTO/COR	LÍQUIDO, AMARELO ESVERDEADO	OK
ODOR	CARACTERÍSTICO, CÍTRICO	OK
IMPUREZAS	ISENTO	OK
DENSIDADE 20°C	0.835 – 0.865	0.848
ÍNDICE DE REFRAÇÃO 20°C	1.465 – 1.485	1.474
PAÍS DE ORIGEM		BRASIL
PRINCIPAIS COMPONENTES GC-MS (aprox..)	Limoneno: 68,3% β-Pineno: 11,5% γ-Terpineno: 9,3% Mirceno: 1,6% α-pineno: 1,8% Geranial: 1,2% Sabineno: 1,5%	
EXTRAÇÃO	PRENSAGEM A FRIO DOS FRUTOS.	
OBS.: não contém OGM nem foi utilizado para testes em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente, e, segundo a RDC 481/99, não é suscetível a contaminação microbiológica.		

RECOMENDAÇÕES ESPECIAIS

Manuseio	Não Ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual. Produto inflamável a temperatura acima de 46° C.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 30 / Número da ONU: 2319 / Classe ou Subclasse de Risco: 3 / Descrição da classe ou subclasse: Líquidos inflamáveis / Grupo de Embalagem: III

Obs: Este certificado de análise foi emitido eletronicamente, ficando dispensado de assinatura.

QUINARÍ FRAGRÂNCIAS E COSMÉTICOS LTDA
 CNPJ 05.424.392/0001-30 / IE 90271470-78
 Rua Dr Paula Xavier, 1304, Centro
 Ponta Grossa/PR
 CEP 84010-270

LAUDO TÉCNICO
CAPIM LIMÃO OE (*Cymbopogon*
citrat)
 LEMONGRASS OIL



FABRICAÇÃO: 01/2018

VALIDADE: 01/2020

LOTE: 17P6204648

CAS Number: 8007-02-1

TESTE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
ASPECTO/COR	LÍQUIDO, AMARELO A ALARANJADO	OK
ODOR	FRESCO, ENCORPADO, LIMÃO	OK
IMPUREZAS	ISENTO	OK
DENSIDADE 20°C	0.875 – 0.905	0.895
ÍNDICE DE REFRAÇÃO 20°C	1.475 – 1.495	1.486
ROTAÇÃO ÓPTICA 20°C	[-4° ; +1°]	-2.2°
PONTO DE EBULIÇÃO	224° C	OK
PAÍS DE ORIGEM		BRASIL
PRINCIPAIS COMPONENTES GC-MS (aprox..)	Citral: 72% (Geranial 43% + Neral 29%) β-Mirceno: 8,8% Geraniol: 4,5% Óxido de Limoneno: 3,3% 1,8-Cineol: 1,8% Linalol: 1,5%	
EXTRAÇÃO	DESTILAÇÃO A VAPOR DAS FOLHAS.	
OBS.: não contém OGM nem foi utilizado para testes em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente, e, segundo a RDC 481/99, não é suscetível a contaminação microbiológica.		

RECOMENDAÇÕES ESPECIAIS

Manuseio	Não Ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual. Flash Point: 90° C
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco: 90 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de Risco: 9 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III

Obs: Este certificado de análise foi emitido eletronicamente, ficando dispensado de assinatura.

QUINARÍ FRAGRÂNCIAS E COSMÉTICOS LTDA
 CNPJ 05.424.392/0001-30 / IE 90271470-78
 Rua Dr Paula Xavier, 1304, Centro
 Ponta Grossa/PR
 CEP 84010-270