



**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Trabalho de Conclusão de Curso**



**Avaliação da Estabilidade Física de Emulsões Contendo
Limoneno**

Katherine Xavier Bastos

**João Pessoa – PB
Dezembro – 2014**

Avaliação da Estabilidade Física de Emulsões Contendo Limoneno

Trabalho de Conclusão de Curso desenvolvido e apresentado no âmbito do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^o. Msc. Pablo Queiroz Lopes

Katherine Xavier Bastos

João Pessoa – PB
Dezembro – 2014

KATHERINE XAVIER BASTOS

**Avaliação da Estabilidade Física de Emulsões Contendo
Limoneno**

Aprovada em ____ de _____ de 2014

Banca Examinadora:

Prof. Msc. Pablo Queiroz Lopes
(Orientador)

Msc. Lucas de Oliveira Monte
(Membro)

Prof . Msc. José Damião Chaves Borba
(Membro)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, pelas vezes que **ELE** segurou minha mão nas horas em que eu mais precisei, por ter me dado a força necessária para passar todo esse tempo distante de todos que me amam verdadeiramente, por ter caminhado comigo nesses anos de graduação não me deixando desviar do meu foco e por toda as bênçãos derramadas até hoje.

A minha família, principalmente a minha mãe **Socorro** e ao meu pai **Cimar** pelo amor, paciência, incentivo, pelas palavras de conforto nos momentos necessários, por conseguir decifrar o que minha voz quer transmitir mesmo distante, e ao meu irmão **Ibisen** que sempre está vibrando em cada vitória comigo.

As minhas Avós **Maria Neusa** e **Maria Xavier** por todas orações e apoio.

Ao meu noivo **Emídio**, pela paciência, confiança e compreensão depositada em mim durante todo esse tempo de graduação distante.

A minha amiga **Ana Paula** pela amizade, companheirismo desde o início do curso até os dias atuais, principalmente nessa reta final compartilhando felicidades e angústias.

Aos meus amigos construídos na turma Farmácia 2010.1, em especial **Luan**, por tantas noites acordadas, estudando juntos e compartilhando desespero, risadas, como também palavras de força.

Ao meu orientador Professor **Pablo Queiroz Lopes**, pela amizade, orientação e oportunidade de desenvolver esse trabalho.

A minha banca examinadora pela disponibilidade em fazer parte desse trabalho e contribuir cientificamente com o mesmo.

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Estrutura química do R (+) limoneno e do S-(-)-limoneno	7
Figura II: Óleo Essencial	12
Figura III: Análise do IC Micro-emultócrito do primeiro dia de experimento	34
Figura IV. Curvas do pH versus valores de EHL para cada dia de experimento	35
Figura V. Curvas da condutividade versus valores de EHL para cada dia de experimento.....	36

LISTA DE TABELAS E GRAFICOS

Tabela I: Valores do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo das Emulsões Contendo Óleo Essencial 19

Tabela II: Aspecto macroscópico e índice de cremagem das emulsões base de limoneno armazenados a 25°C por 180 dias..... 23

Tabela III:Aspecto macroscópico e índice de cremagem das emulsões base de limoneno armazenados a 5°C por 180 dias 23

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. - Antes de Cristo

AINE - Anti inflamatório Não Esteroidal

A/O - Água / Óleo

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C - Carbono

D - Dia

DL₅₀ - Dose letal para 50% dos indivíduos em análise

EHL- Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico

EUA - Estados Unidos da América

ERO - Espécies Reativas ao Oxigênio

F- Formulação

GST- Glutathione S- Transferase

HLB - Hydrophilic-lipophilic balance

IC – Índice de cremagem

KCl – Cloreto de potássio

Kg – Quilograma

N – Normal

Min - Minuto

O/A - Óleo/ Água

OE - Óleo Essencial

OMS - Organização Mundial de Saúde

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotações por minuto

SNC - Sistema Nervoso Central

SUS - Sistema Único de Saúde

TPM - Tensão Pré Menstrual

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
1.1 Considerações sobre óleos essenciais	2
1.2 Considerações sobre o Limoneno	7
1.3 Considerações sobre o uso de fitoterápicos no Brasil	10
2. ARTIGO	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
2.1 INTRODUÇÃO	15
2.2 METODOLOGIA	18
2.2.1 MATERIAIS	18
2.2.2 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA DAS EMULSÕES	18
2.2.3 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES	19
2.2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES	20
2.2.4.1 Estabilidade a Longo Prazo	20
2.2.4.1.1 Índice de Cremagem	20
2.2.4.1.2 Avaliação do pH	20
2.2.4.1.3 Avaliação de Condutividade	21
2.2.4.2 Estabilidade a Curto Prazo	21
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
2.5 AGRADECIMENTOS	28
2.6 BIBLIOGRAFIA	29

Fundamentação Teórica

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Considerações sobre óleos essenciais

A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais, tanto na medicina como no controle de pragas e em mecanismos de defesa, com destaque para a civilização Egípcia, Grecoromana e Chinesa. Sendo que a Medicina Tradicional Chinesa desenvolveu-se com grandiosidade e eficiência. Nos tempos atuais, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados visando o entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos⁸².

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial empregam frequentemente as medicinas indígenas ou tradicionais em suas necessidades primárias de saúde, especialmente aquelas que se utilizam de terapias que envolvem o uso de fitoterápicos⁵.

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais (OE), utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico²⁹.

Paracelso introduziu o termo óleo essencial durante a Renascença e este designava “a alma da planta”, a quintessência para a cura. Anteriormente a este período, Roma após invadir territórios, como o Egito, disseminou o uso de plantas aromáticas em banhos, sendo que os romanos chegaram a ter mais de 1000 casas de banho por volta de 753 a.C.⁶⁷.

A história da pesquisa de Óleos Essenciais no Brasil remonta aos trabalhos de Theodor Peckolt, farmacêutico originário da Silésia alemã (atual Polônia), que chegou ao Brasil em 1847⁵⁵. Pinto estudou e publicou vasta literatura sobre a flora brasileira (cerca de 170 trabalhos), a maioria em periódicos alemães, incluindo dados sobre rendimento e composição de óleos essenciais³⁴.

Os óleos essenciais podem apresentar uma mistura de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que destes, dois ou três compostos podem ser considerados majoritários por estarem presentes em

altas concentrações (20 a 70%). Geralmente, estes componentes majoritários determinam as propriedades biológicas do óleo essencial. Eles incluem dois grupos de distintas origens biossintéticas, o primeiro grupo é formado por terpenos e terpenóides e o segundo grupo por fenil propanóides, ambos de baixo peso molecular⁷. Os primeiros são formados pela condensação de unidades de isopreno (C5) que são provenientes da rota biossintética do ácido mevalônico ou do fosfato de deoxi-xilulose. Os fenil propanóides são biossintetizados a partir da rota do ácido chiquímico²⁶. Os terpenos mais comumente encontrados são monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20)⁷. Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente oxigênio, são denominados terpenóides. Os terpenóides representam uma das maiores e mais variadas classes de metabólitos secundários de origem natural, com mais de 55.000 membros já isolados³¹.

Na medicina popular, assim como na terapêutica, plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativas, tranqüilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. Compostos como linalool, limoneno e citronelol possuem ação anticonvulsivante, enquanto mentol e mirceno, atividade analgésica. Muitos derivados monoterpênicos têm demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo sedativa, antinociceptiva e antidepressiva^{54,73,53,42}.

Possui grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol, que são terpenóides^{70,23}.

As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais, são utilizadas desde o início da história da humanidade para saborizar comidas e bebidas; empiricamente usadas para disfarçar odores desagradáveis; atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo também para a comunicação entre os indivíduos e influenciando o bem-estar dos seres humanos e animais, demonstrando assim uma antiga tradição sociocultural e socioeconômica da utilização destes produtos³².

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OE são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes, possibilitando assim que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas⁸.

Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, pode-se entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de mono (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis³².

A capacidade citotóxica de óleos essenciais, baseados em sua capacidade prooxidante, pode fazer deles excelentes antissépticos e antimicrobianos para uso pessoal, purificar o ar, para higiene pessoal, inseticida para preservação de grãos e estoques de alimentos além do que alguns óleos essenciais demonstraram clara capacidade antimutagênica que pode estar ligada assim a sua atividade anticarcinogênica.

O geraniol, substância encontrada em algumas composições de óleos essenciais demonstrou inibição da proliferação de células de câncer de colón, induzindo a membrana destas células a despolarização, interferindo nos canais iônicos e passagens de sinais.

As propriedades medicinais popularmente descritas sobre o óleo de gerânio são ação analgésica, regulador das hiposecreções androgênicas e estrógenas, diurético, hemostático, repelente de inseto, cicatrizante, indicado para menopausa, tensão pré-menstrual (TPM), acne, entre outras. Também foram atribuídas ações psicológicas e emocionais como relaxante, porém reanimador, aliviando a tensão nervosa, angústia e depressão. Estas propriedades são importantes para justificar o seu uso na Aromaterapia^{67,22,80}.

Os óleos essenciais apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE's variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta

utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita através de pesquisas envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos testados. Em revisão sobre o assunto, Greay & Hammer (2011) cita alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre células bacterianas.

Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas⁵⁸, e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella* entérica²⁷. Ao investigar a atividade antimicrobiana de sesqui-e diterpenos isolados da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) contra bactérias cariogênicas, Souza et al. (2011) descreveram uma maior eficiência para os compostos com apenas um grupo hidrofílico frente aos que apresentaram dois grupos⁷⁴.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é adicionado aos alimentos com a finalidade de se acrescentar sabor e aumentar a validade dos alimentos, além do uso medicinal em prevenção e curas de afecções diversas, como falta de apetite, asma, tonsilite, obstrução nasal e constipação. Constituído essencialmente por monoterpenos, o óleo essencial de alecrim apresenta potencial atividade antifúngica e inibitória sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas, e principalmente, Gram positivas⁶.

Baccharis dracunculifolia, conhecida como alecrim do campo ou vassoura, é um arbusto nativo do Brasil, produtor de uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos destes coletados e utilizados por abelhas da espécie *Apis mellífera* na elaboração da consagrada própolis verde brasileira. Tanto a própolis quanto os derivados vegetais (extratos e óleo essencial) do alecrim do campo são reconhecidos medicinalmente por suas ações antiulcerogênica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anestésica, hipotensiva, imunoestimuladora e citostática. Assim como ocorre com o alecrim do campo, as resinas e exsudatos de assa peixe (*Vernonia*

polyanthes) também são coletados por abelhas e utilizados na síntese da própolis negra, originária do estado de Minas Gerais. Na medicina popular, esta espécie é empregada no tratamento de reumatismo, bronquite, tosse, gripe, pneumonia, febres, malária, hipertensão, entre outros⁶⁵.

O óleo essencial obtido das inflorescências do cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus*) é empregado tradicionalmente com várias finalidades, incluindo produtos para higiene bucal, ação antisséptica, analgésica, antifúngica, antialérgica anticarcinogênica, mutagênica, inseticida e antibacteriana. O eugenol é o principal componente isolado do OE de cravo, sendo a ele atribuída a atividade antimicrobiana descrita por este óleo, sendo que alguns trabalhos sugerem seu uso como conservante natural de alimentos⁶⁵.

1.2 Considerações sobre o Limoneno

O Limoneno (Figura I) é um monoterpreno com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ monocíclico faz parte da estrutura de mais de 300 vegetais⁴. Os dois enantiômeros do Limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. *S*-(-)-limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto *R*-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, sendo a prevenção da desidratação e a inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais²⁵.

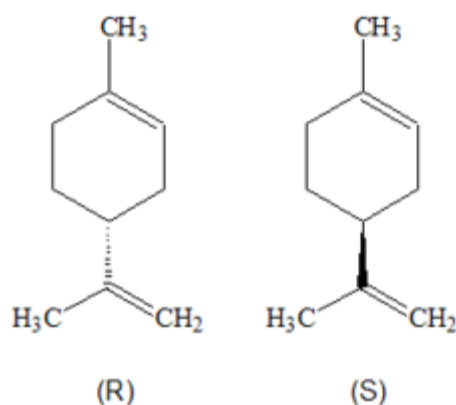


Figura I. Estrutura química do R (+) limoneno e do S(-)-limoneno

No caso dos óleos essenciais dos cítricos em geral, o *R*-(+)-limoneno é seu componente mais expressivo, atingindo concentrações de 90 a 96%^{5,6}. Aproximadamente 50 mil t de *R*-(+)-limoneno são recuperadas ao ano como subproduto da indústria cítrica mundial^{49,11}.

Segundo Lima et al., (2013), o Limoneno administrado por via inalatória demonstrou efeito ansiolítico indicando que esse componente pode ser utilizado para esse fim em tratamentos de aromaterapia.

Este terpeno está listado no *Code of Federal Regulation* dos EUA como uma molécula segura para ser usada como flavorizante. Em média, uma pessoa de 60 kg dos EUA ingere cerca de 16,2 mg de d-limoneno por dia na alimentação⁴⁷. O consumo de doses diárias deste terpeno por mais de um ano em humanos, apresentou baixíssima toxicidade⁷⁶. Além disso, este composto é

rapidamente e quase que completamente absorvido pela via oral tanto em humanos quanto em animais experimentais³⁶. A DL₅₀ (dose letal capaz de causar mortalidade em 50% dos animais) de d-limoneno em ratos machos e fêmeas é de 4,4 e 5,1 g/kg, respectivamente⁴⁵. Estes dados comprovam, portanto, a baixa toxicidade deste composto em ensaios *in vivo*. Testes em animais também têm comprovado a eficácia do d-limoneno contra vários tipos de câncer como os de mama, adenoma pulmonar, fígado e gástrico⁷⁶. Gerhäuser e colaboradores (2003)³³ e Wei & Shibamoto (2007)⁸³ demonstraram que d-limoneno possui comprovada ação antioxidante ao inibir a expressão das espécies reativas ao oxigênio (ERO) em ensaios *in vitro*.

Lieshout *et al.*, (1998)⁴⁴ demonstraram que o d-limoneno foi capaz de aumentar os níveis de glutatona S-transferase (GST), enzima com atividade antioxidante e anticâncer. Souza *et al.*, (2003)⁷⁵ e Toro-Arreola *et al.* (2005)⁷⁸ comprovaram que o Limoneno também tem comprovada atividade antiasmática, pois diminuiu o infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar em ratos asmáticos³⁸.

Moraes e colaboradores (2009) demonstraram que o Limoneno apresentou atividade gastroprotetora frente à úlceras gástricas induzidas por AINE.

As plantas do gênero *Citrus* foram anteriormente estudadas em relação à atuação no sistema nervoso central e suas propriedades ansiolítica e antidepressiva foram comprovadas, essas atividades farmacológicas são atribuídas ao Limoneno, monoterpene majoritário presente no óleo essencial extraído das plantas deste gênero^{18,19,63}. O Limoneno é geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência à autooxidação e polimerização, tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial.

Em 2000, Larsen *et al* publicaram uma pesquisa envolvendo os dois enantiômeros do Limoneno com intuito de saber os seus efeitos sobre o trato respiratório. Os resultados obtidos demonstraram que os dois não promoveram irritação pulmonar, porém, induziram um ligeiro efeito broncoconstrictor⁴¹. Pesquisas realizadas em 2009 mostraram que o Limoneno possui uma ação promissora na prevenção de danos gástricos, pois ocorre um aumento na

produção de muco gástrico induzida pela conservação dos níveis basais de PGE2⁴⁸. Em outro estudo, em 2010, comprovou a ação gastroprotetora do *Citrus lemon* (Rutaceae) que possui como um dos compostos majoritários o limoneno⁶². Estudos publicados em 2012 mostram que o R (+)-limoneno inibiu o estresse oxidativo, a via de sinalização Ras e a inflamação exibindo efeitos quimiopreventivos sobre a redução de tumores induzidos na pele animais²⁰.

Pesquisas em nível de SNC mostraram que o R(+)-limoneno quando administrado intraperitonealmente apresentou atividade antinociceptiva e que esta atividade provavelmente pode está ligada a analgesia periférica sem acontecer à estimulação de receptores²⁸.

Dessa forma, a obtenção de uma emulsão preparada a partir do Limoneno enquadra-se como produto fitoterápico e seria de grande valia em virtude dos benefícios que esse óleo essencial pode trazer à população.

1.3 Considerações sobre o uso de fitoterápicos no Brasil

A Organização Mundial de Saúde (OMS) constatou que práticas não convencionais de saúde, tais como acupuntura, fitoterapia e técnicas manuais estão em desenvolvimento, ganhando espaço de modo complementar às terapias medicamentosas alopáticas⁵².

Para grande parte da população o uso de plantas medicinais é visto como uma integrativa histórica à utilização de medicamentos sintéticos, visto que os últimos são considerados mais caros e agressivos ao organismo. A disseminação do uso de plantas medicinais, assim como a automedicação deve-se principalmente ao baixo custo e fácil acesso à grande parcela da população⁵².

Visando o custo de desenvolvimento dessa categoria de produtos, os países subdesenvolvidos como o Brasil oferecem integrativa terapêutica bastante promissora para a população. O país é visto em destaque por possuir um terço da flora mundial, além de ser a Amazônia a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. Esta intensa presença vegetal faz com que as pesquisas e o próprio desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos possam ocorrer como destaque no cenário científico mundial⁸⁵.

No país, existem iniciativas do governo para valorização do conhecimento popular e da utilização de produtos naturais pela população em seus cuidados primários de saúde. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é um importante exemplo, sendo que este tem como base os fundamentos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, tendo como princípios orientadores: a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção a saúde aos usuários do Sistema Único de Saúde – SUS, bem como o uso sustentável da biodiversidade brasileira, a valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais, entre outros¹⁴. Segundo Barros e Nunes (2006)⁹, as terapias naturais no Brasil são norteadas pelo pensamento de que uma forma de medicina não é oposta ou contrária a outra.

O Ministério da Saúde através da Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006 disponibiliza opções terapêuticas e preventivas aos usuários do SUS, dentre elas o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos além de afirmar,

baseado em levantamento realizado em 2004, que 116 municípios de 22 estados brasileiros fazem uso da fitoterapia¹⁵.

Portanto, os tratamentos medicinais de origem vegetal são amplamente utilizados no Brasil como integrativa terapêutica, em destaque por aqueles que estão em tratamento de doenças crônicas e fazendo uso de outros medicamentos².

Segundo a RDC No- 26, DE 13 DE MAIO DE 2014, são considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização.

Segundo a Resolução Diretoria Colegiado (RDC) nº 02, de 15 de janeiro de 2007¹⁴, os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetais obtidos por processos físicos, tais como destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado. Podem ser extraídos de caules, flores, frutos e raízes de diversas espécies vegetais possuindo diferentes aplicações¹⁷. São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, metabólitos que conferem suas características organolépticas.

2. ARTIGO



Fonte:oleobeneficios.com.br

Avaliação da Estabilidade Física de Emulsões Contendo Limoneno

Katherine Xavier Bastos¹, Pablo Queiroz Lopes¹, Mateus Feitosa Alves²

- 1. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus I, João Pessoa, Paraíba.**
- 2. Universidade Federal da Paraíba, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Campus I, João Pessoa**

Artigo a ser submetido para a publicação na Revista Farmacognosia

RESUMO

Durante os últimos anos o Ministério da Saúde tem disponibilizado opções terapêuticas e preventivas aos usuários do SUS, dentre elas o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Os óleos vegetais naturais apresentam inúmeras vantagens para uso terapêutico, como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, e são renováveis quanto à disponibilidade em relação aos derivados do petróleo que são finitos, dentre esses óleos temos o limoneno que apresenta várias atividades dentre elas a função de gastroprotetora frente à úlceras gástricas induzidas por drogas anti-inflamatórias não esteroidais bem como atividades anti-inflamatórias, bem como atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral e antiparasitária. O desenvolvimento de sistemas terapêuticos lipídicos torna-se necessário com o objetivo de se obter uma forma farmacêutica tecnicamente mais elaborada e com maior segurança em relação à utilização do limoneno puro. Neste contexto, surgem as emulsões que são sistemas termodinamicamente instáveis formados por gotículas microscópicas, dispersas dentro de outro líquido com polaridades diferente entre si, estabilizado por um ou mais tensoativo. O estudo das condições ótimas de equilíbrio da proporção de tensoativo usado no sistema para estabilizar a fase interna dentro de um sistema emulsionado corresponde ao Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico(EHL). As emulsões foram preparadas pelo método da temperatura com inversão de fase, onde foram obtidos dois lotes de 14 emulsões, um lote armazenado à temperatura ambiente e outro a 5°C, então foram caracterizadas quanto à estabilidade longo e curto prazo. A formulação 7 contendo Limoneno foi considerada a mais estável, com valor de EHL de 10,7.

Palavras chaves: Emulsões, Limoneno, EHL, Estabilidade

ABSTRACT

In recent years the Ministry of Health has provided therapeutic and preventive options to users of SUS, among them the use of medicinal plants and herbal medicines. Natural vegetable oils have many advantages for therapeutic use, such as low toxicity, biodegradability, and are renewable for availability in relation to petroleum that are finite, among these oils have limonene which features various activities among them gastroprotective function front of gastric ulcers induced by anti-inflammatory drugs nonsteroidal anti-inflamórias and activities as well as antimicrobial, antifungal, antitumor and anti-parasitic. The development of therapeutic lipid systems becomes necessary in order to obtain a more technically elaborate pharmaceutical form and greater safety for the use of pure limonene. This raises the emulsions are thermodynamically unstable systems comprised of microscopic droplets dispersed in another liquid having polarities different from each other, stabilized by one or more surfactant. The study conditions for the optimal balance of the proportion of surfactant used in the system to stabilize internal phase in an emulsified system corresponds to the hydrophilic-lipophilic balance (HLB). The emulsions were prepared by the method of temperature with phase inversion, which were obtained from two batches of emulsion 14, a lot stored at room temperature and another at 5 ° C were then characterized for long and short term stability. The limonene-containing formulation 7 was considered the most stable with HLB value of 10.7.

Key words: Emulsions, Limonene, HLB, Stability

2.1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais naturais apresentam inúmeras vantagens para uso terapêutico, como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, e são renováveis quanto à disponibilidade em relação aos derivados do petróleo que são finitos⁸⁴.

Uma das olefinas de fontes renováveis de maior importância no Brasil é o Limoneno, terpeno que compõe cerca de 90% do óleo da casca da laranja. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com uma produção, entre 2010-2011, de cerca de 15,33 milhões de toneladas do fruto, dos quais 89% da produção são destinadas à produção de suco, sendo a casca e o óleo fixo, resíduos do processo. A parte volátil do óleo é constituída majoritariamente de (R)-limoneno (90%). Terpenos como o Limoneno, podem ser submetidos a reações de oxidação catalítica nos quais os epóxidos são os principais produtos, e podem ser utilizados como precursores para uma ampla variedade de produtos como fármacos, fragrâncias e na fabricação de biopolímeros e resinas¹³.

O óleo essencial Limoneno apresenta várias atividades dentre elas a função de gastroprotetora frente à úlceras gástricas induzidas por drogas anti-inflamatórias não esteroidais bem como atividade antiinflamatórias⁴⁸.

Em diversos estudos, o Limoneno e seus derivados apresentam interessantes atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana do óxido de limoneno e aminas do limoneno, bem como óleos essenciais contendo limoneno³⁹, atividade antifúngica do análogo sintético, do óxido de limoneno¹⁰ e do óleo essencial, atividade antitumoral do limoneno, do óxido e seus derivados^{1,79,24}, atividade ascaricida e inseticida^{35,56,24} e atividade antiparasitária^{60,61,3}.

O desenvolvimento de sistemas terapêuticos lipídicos torna-se necessário com o objetivo de se obter uma forma farmacêutica tecnicamente mais elaborada e com maior segurança em relação à utilização do Limoneno puro. Neste contexto, surgem as emulsões que são sistemas termodinamicamente instáveis formados por gotículas microscópicas, dispersas dentro de outro líquido com polaridades diferente entre si, estabilizado por um ou mais tensoativo^{43,46,21}.

Apresenta-se como o veículo ideal para diversas aplicações cosméticas e farmacêuticas (solubilização dos componentes hidro e lipofílicos), além de outras vantagens como facilidade de absorção da pele, biodisponibilidade elevada, administração endovenosa de nutrientes lipídicos, custo reduzido se comparado às soluções, consegue mascarar sabor e odor desagradáveis, e pode ser utilizado para uso interno e externo.

Uma boa emulsão apresenta gotículas pequenas, lenta agregação, facilidade de redispersabilidade e é estável química e fisicamente. A mesma têm como finalidade tornar possível a administração numa única mistura de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis.

De acordo com a natureza da fase externa, contínua ou ainda conhecida como dispersante podem ser classificadas em: emulsão água em óleo (A/O) a que contém água como fase dispersa sob a forma de pequenas partículas (maior que 0,1 mm) na fase oleosa e óleo em água (O/A) a emulsão composta pela dispersão de material oleoso/graxo na fase aquosa⁴⁸.

Os agentes emulsivos, com propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água, têm papel fundamental na estabilização de emulsões. Entretanto estes compostos não conseguem diminuir a tensão interfacial a ponto de contrariar totalmente a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área interfacial⁵⁰.

Uma emulsão estável é aquela cujas gotículas dispersas mantêm suas características iniciais e permanecem uniformemente distribuídas por toda a fase contínua. Entretanto, podem ocorrer vários tipos de desvio de desvios desse comportamento ideal, como consequência dos processos de instabilidade que comprometem o sistema. As emulsões instáveis se manifestam das seguintes formas⁶⁸: floculação, onde as gotículas se agregam em aglomerados frouxos, dentro da emulsão, conservando sua identidade individual, mas cada aglomerado comporta-se fisicamente como uma unidade única; coalescência que é caracterizada por uma larga distribuição de tamanho das gotículas, resultando na separação de fases de forma visível ao olho nu; creme onde a fase dispersa, conforme sua densidade relativa à fase contínua, sobe até à superfície ou desce até o fundo da emulsão, formando uma camada de emulsão mais concentrada.

O estudo das condições ótimas de equilíbrio da proporção de tensoativo usado no sistema para estabilizar a fase interna dentro de um sistema emulsionado corresponde ao Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico(EHL). Este representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares.

O sistema, introduzido por Griffin em 1949, uma escala numérica adimensional de valores entre 1 e 20 é usada para descrever a natureza do agente tensoativo, sendo que os valores de EHL aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. O equilíbrio hidrófilolipófilo de um tensoativo é uma propriedade importante no processo de emulsificação, posto que determina o tipo de emulsão que tende a produzir. Agentes emulsivos de EHL baixo tendem a formar emulsões água/óleo, ao passo que aqueles com EHL alto formam emulsões óleo/água^{40,43}. Portanto, o conhecimento dos valores de EHL permite prever o tipo de comportamento esperado do composto, fornecendo desta forma orientação para suas aplicações práticas.

Assim, a escolha do emulsionante ou mistura de emulsionantes mais apropriada bem como a concentração a ser utilizada que até então precisava ser feita pelo método tentativa-erro até que fosse obtido o resultado desejado, passou a ser feito de forma mais racional, a partir da classificação de Griffin⁵⁷.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo obter uma forma farmacêutica tecnicamente elaborada preparando diferentes emulsões contendo limoneno, avaliando a sua estabilidade física e determinando o seu Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 MATERIAIS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Farmacotécnica na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) .

Foi utilizado o (R) - Limoneno adquirido da Dierberger Laboratórios.

Os surfactantes (Span 80[®] e Tween 20[®]) foram adquiridos da Sigma.

Todos os produtos e reagentes utilizados foram de alto grau de pureza.

2.2.2 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA DAS EMULSÕES

2.2.2.1 Planilha Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico

As emulsões foram preparadas seguindo o mesmo desenho folha de cálculo apresentado na Tabela I. Essa folha de cálculo inclui dois agentes tensoativos: um de natureza lipofílica (Span[®] 80, EHL= 4,3) e o outro de uma natureza hidrofílica (Tween[®] 20, EHL= 16,7). O último valor de EHL de cada sistema variou de acordo com a proporção relativa de cada surfactante.

Tabela I: Valores do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo das Emulsões Contendo Óleo Essencial

Formulação	TWEEN 20 [®]		SPAN 80 [®]		Valor EHL Final
	(%)	EHL	(%)	EHL	
F1	100.0	16.7	0.0	0.0	16.7
F2	91.9	15.4	8.1	0.3	15.7
F3	83.9	14.0	16.1	0.7	14.7
F4	75.8	12.7	24.2	1.0	13.7
F5	67.7	11.3	32.3	1.4	12.7
F6	59.7	10.0	40.3	1.7	11.7
F7	51.6	8.6	48.4	2.1	10.7
F8	43.5	7.3	56.5	2.4	9.7
F9	35.5	5.9	64.5	2.8	8.7
F10	27.4	4.6	72.6	3.1	7.7
F11	19.4	3.2	80.6	3.5	6.7
F12	11.3	1.9	88.7	3.8	5.7
F13	3.2	0.5	96.8	4.2	4.7
F14	0.0	0.0	100.0	4.3	4.3

F- Formulação, EHL- Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

2.2.3 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES

As emulsões foram obtidas pelo método da temperatura de inversão de fase. Cada tipo de emulsão O/A manipulada apresentava 100 mL, sendo 5% (p/p) de um óleo (5g), 2% (p/p) de surfactante (2g) e 93% (p/p) de água (93mL). Inicialmente, a fase contínua foi preparada por dispersão de Tween 20[®] em água destilada. A fase dispersa foi obtido por fusão Span 80[®] no óleo essencial. Ambas as fases foram aquecidos separadamente a 70°C e, em seguida, misturadas. Emulsões finais foram obtidos após a homogeneização utilizando um Ultra-Turrax (IKA, mod. T-18, Staufen, Alemanha) a 15.500 rpm durante 10 min. Dois lotes de 14 emulsões foram obtidos e armazenadas a 25 ± 2°C e 5 ± 1°C.

2.2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

2.2.4.1 Estabilidade a Longo Prazo

O aspecto macroscópico, índice de cremagem (IC), pH e condutividade foram avaliados em dias de armazenamento de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e a baixa temperatura ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Estes parâmetros foram capazes de avaliar a estabilidade do sistema de emulsão e, portanto, prever a estabilidade química dos componentes da emulsão. Na verdade, se uma instabilidade ocorre para qualquer componente químico, isso será refletido sobre a estabilidade físico-química do sistema^{77,46}.

2.2.4.1.1 Índice de Cremagem

O IC foi determinado experimentalmente pela medição do creme. Os valores de IC foram obtidos pela razão entre a altura total da creme (CC) e a altura total da camada de emulsão (TC) de acordo com a eq. 1⁴⁶. CC e CT foram medidos direto em tubos de ensaios de armazenamento com a ajuda de uma escala graduada.

$$\% C = (CC / CT) \times 100$$

onde CC= altura total da camada de creme e CT= altura total da emulsão.

2.2.4.1.2 Avaliação do pH

Medições pH das emulsões foram realizadas utilizando um medidor de pH pré-calibrado (Cap-Lab, mod. PG1800, São Paulo, Brasil).

2.2.4.1.3 Avaliação de Condutividade

A condutividade foi medida usando um condutivímetro portátil (MITE, mod. CD30, São Paulo, Brasil), previamente calibrado com uma solução padrão de 0,1 N KCl.

2.2.4.2 Estabilidade a Curto Prazo

A estabilidade a curto prazo foi avaliada por meio da técnica de micro-emultócrito (TME)^{77,46}. No que diz respeito à análise de micro-emultócrito, tubos capilares com heparina livre foram cheios até 75%, com cada formulação e colocada numa micro-centrífuga (Quimis, São Paulo, Brasil) a 10.500 rpm durante 10 min. Após o ciclo de centrifugação, os tubos capilares foram colocados contra a escala micro-emultócrito e o creme foi medido diretamente. O aspecto visual foi avaliado a fim de investigar a separação de fases. Para as preparações, que não foram quebradas, IC foi medida pela escala de leitura de micro-emultócrito.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse trabalho, o processo de inversão de fase foi satisfatória para a produção de emulsões O/A contendo o óleo Limoneno, visto que permaneceu estável sem alterações visuais por 24h. O principal desafio na formulação de uma emulsão é devido ao fato que o sucesso ou a falha de tais sistemas termodinamicamente instáveis só pode ser avaliado depois de um longo prazo de estudo. Além disso, a otimização das formulações torna-se mais complexa, especialmente sobre a determinação do EHL requerido. A fim de reduzir o tempo e esforço experimental, vários métodos de curto prazo são sugeridos na literatura para avaliar fenômenos de desestabilização de emulsão⁵¹, como a condutividade^{12,71,72}, e/ou formação de creme⁵⁹. Recentemente, o microemultócrito foi o método proposto como instrumento para prever a estabilidade da emulsão⁴⁶.

As emulsões foram avaliadas macroscopicamente por 180 dias. Macroscopicamente, à temperatura ambiente, as formulações F5, F6 e F7, correspondendo respectivamente às formulações de EHL 12,7; 11,7 e 10,7 não apresentaram grandes variações durante os 6 meses de estudo, como podemos ver na Tabela II. As formulações acima citadas apresentaram índice de cremagem pequeno e a variação nesse índice durante todo o experimento também foi mínima. Já as emulsões F11, F12, F13 e F14 apresentaram uma maior instabilidade devido a uma maior formação de creme, mas não separaram de fase. F1 a F4 separaram de fase a partir do dia 90 porque não apresentou um equilíbrio entre a fase oleosa e aquosa, não formando dessa forma o filme intacto, com aumento de tamanho das gotículas. Estas últimas emulsões mostraram aumento das camadas de creme, levando à separação de fases, essa instabilidade ocorre devido a um aumento na energia cinética do sistema, em decorrência da maior motilidade de moléculas de água, que na maioria dos casos, é o solvente responsável pelas reações quimicamente instáveis⁶⁴.

Tabela II. Aspecto macroscópico e índice de cremagem das emulsões base de limoneno armazenados a 25°C por 180 dias.

Formulação	EHL	1	3	10	15	30	60	90	120	150	180
F1	16.7	4,05	1,35	5,48	5,56	1,47	0,00	SF	SF	SF	SF
F2	15.7	3,53	3,75	3,85	3,85	1,35	0,00	SF	SF	SF	SF
F3	14.7	2,33	3,70	3,75	3,80	2,63	1,35	SF	SF	SF	SF
F4	13.7	1,18	1,25	1,28	1,39	1,35	1,41	SF	SF	SF	SF
F5	12.7	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F6	11.7	0,00	1,20	1,23	1,25	1,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F7	10.7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F8	9.7	1,16	1,23	1,27	1,27	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F9	8.7	1,19	2,47	2,56	2,60	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F10	7.7	2,35	2,53	5,00	5,06	7,69	0,00	3,80	0,00	0,00	0,00
F11	6.7	2,38	2,38	4,82	4,82	6,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F12	5.7	1,20	1,28	2,56	3,90	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F13	4.7	1,45	2,90	4,35	4,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F14	4.3	1,25	1,25	2,56	2,56	9,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

SF: Separação de fase

Tabela III. Aspecto macroscópico e índice de cremagem das emulsões base de limoneno armazenados a 5°C por 180 dias.

Formulação	EHL	1	3	10	15	30	60	90	120	150	180
F1	16.7	3,85	5,13	6,41	7,69	9,09	7,89	6,67	6,76	6,85	5,56
F2	15.7	3,85	3,85	6,41	6,41	9,09	6,58	6,58	6,67	6,76	5,48
F3	14.7	2,35	3,53	4,71	4,71	7,14	6,02	6,10	6,10	6,25	5,06
F4	13.7	1,30	2,60	2,60	3,90	3,95	4,00	4,00	2,74	4,11	4,11
F5	12.7	0,00	1,20	2,41	2,41	3,66	2,47	2,53	2,56	2,82	2,67
F6	11.7	0,00	1,19	1,18	2,38	2,38	2,41	3,66	3,70	2,53	2,50
F7	10.7	0,00	1,22	1,23	1,25	3,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F8	9.7	0,00	1,20	2,41	2,44	2,44	2,50	2,50	5,13	5,13	5,19
F9	8.7	1,23	1,23	3,75	3,75	5,00	2,53	6,41	5,13	5,19	5,26
F10	7.7	1,20	2,41	3,61	3,61	6,10	6,17	7,41	7,50	7,59	7,59
F11	6.7	1,25	2,50	3,70	3,75	6,25	6,33	8,86	7,69	7,69	7,79
F12	5.7	1,22	1,22	2,47	2,47	5,00	2,53	2,53	7,69	7,79	7,79
F13	4.7	0,00	1,45	2,86	2,86	5,80	0,00	1,47	1,52	9,09	9,23
F14	4.3	1,23	2,47	2,50	2,47	5,00	0,00	1,27	1,28	7,79	10,39

Quando analisadas as emulsões à 5°C (Tabela III), as formulações F5, F6 e F7 também foram as mais estáveis, porém houve uma menor variação na quantidade de creme formado e não observou-se separação de fase em nenhuma emulsão, mostrando dessa forma que a temperatura tem influência na estabilidade da emulsão, uma vez que essa é uma forma farmacêutica termodinamicamente instável e justificando o seu armazenamento na geladeira.

Utilizando o micro-emultócrito como a fonte de instabilidade deste, esse procedimento experimental proporciona informação notável sobre a

estabilidade do sistema, uma vez que acelera a formação de creme ou a sedimentação dos produtos⁴⁶. Além disso, devido à baixa quantidade de amostra e tempo curto de execução, esta técnica pode ser utilizada com sucesso para avaliar e/ou otimizar os parâmetros de formulação, tais como a composição de tensoativo bem como o seu respectivo valor de EHL⁴⁶.

Na análise com micro-emultócrito, as formulações foram analisadas nos dias D1, D30, D60, D90, D120, D150 e D180. No D1 (Figura III), os menores índices de cremagem foram apresentados pelas formulações F1-F8, que apresentaram uma média de IC de no máximo 5,48% enquanto as formulações F10, F11, F12, F13 e F14 mostraram o oposto das formulações iniciais, chegando a conter até 8,65% de creme.

A partir do D30 foi observado separação de fase nessas emulsões, separação essa que se repetiu nessa técnica até o final dos 180 dias.

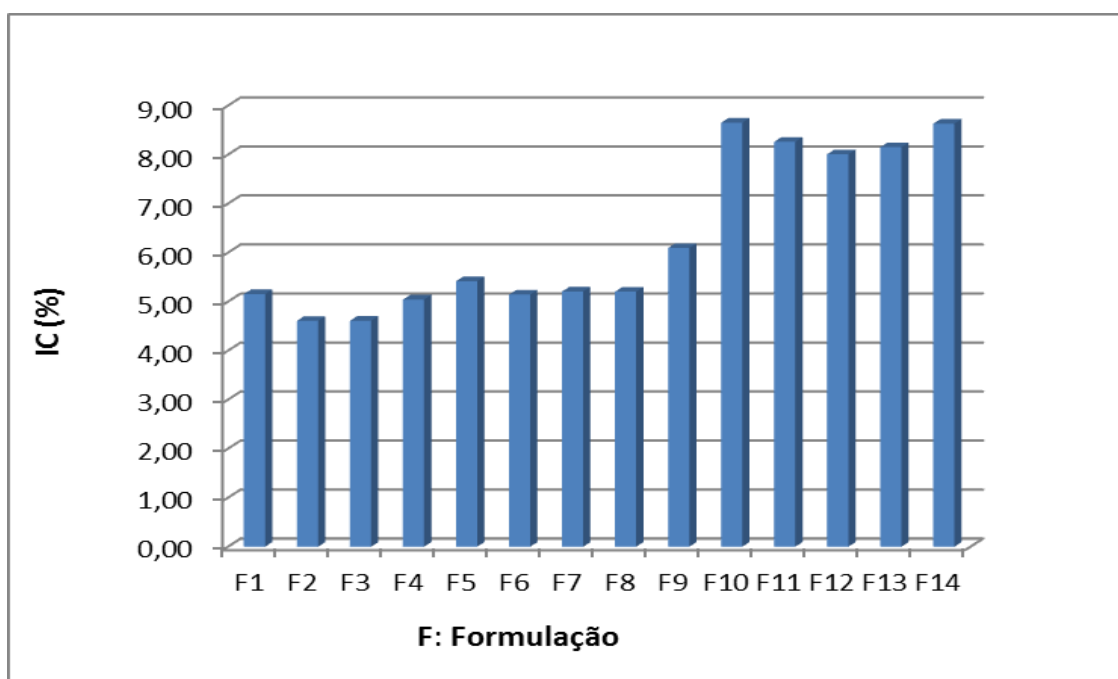


Figura III. Análise do IC Micro-emultócrito do primeiro dia de experimento.

Os resultados da análise do pH (Figura IV) mostram significativa variação do pH nas formulações, demonstrando que ao final dos 180 dias o pH das formulações reduziu, possivelmente devido a decomposição da fase oleosa, não caracterizando nenhuma incompatibilidade das emulsões. As formulações F12, F13 e F14 apresentaram-se como as mais instáveis, uma vez que o desvio padrão dessas formulações ultrapassou 1,75, enquanto que o

desvio padrão observado das formulações F3-F8 não ultrapassou 0,67, mostrando-se, dessa forma, que essas últimas formulações foram as mais estáveis. O valor de pH é uma ferramenta simples que sugere o início da instabilidade.

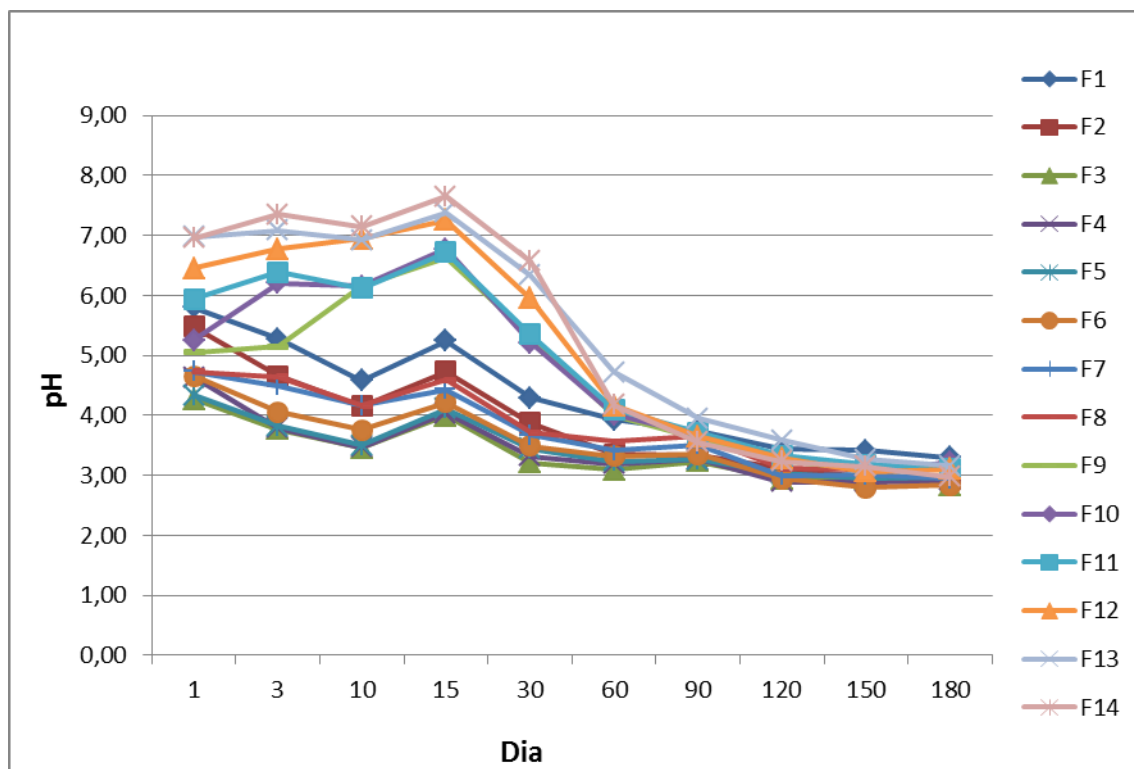


Figura IV. Curvas do pH versus valores de EHL para cada dia de experimento.

Outro parâmetro utilizado para estudar uma emulsão é a condutividade, método esse sensível à alterações mínimas na estrutura do sistema emulsionado. As formulações demonstraram variações nos valores da condutividade (Figura V) ao longo do tempo, o que corrobora com a instabilidade característica de sistemas de emulsão. Tal parâmetro aumentou gradativamente ao longo das análises, aumentando em média $356\mu\text{S}$ até o final do estudo, compatível com a decomposição da fase oleosa, restando a fase aquosa que possivelmente é responsável por esse aumento, uma vez que a água é um bom condutor elétrico.

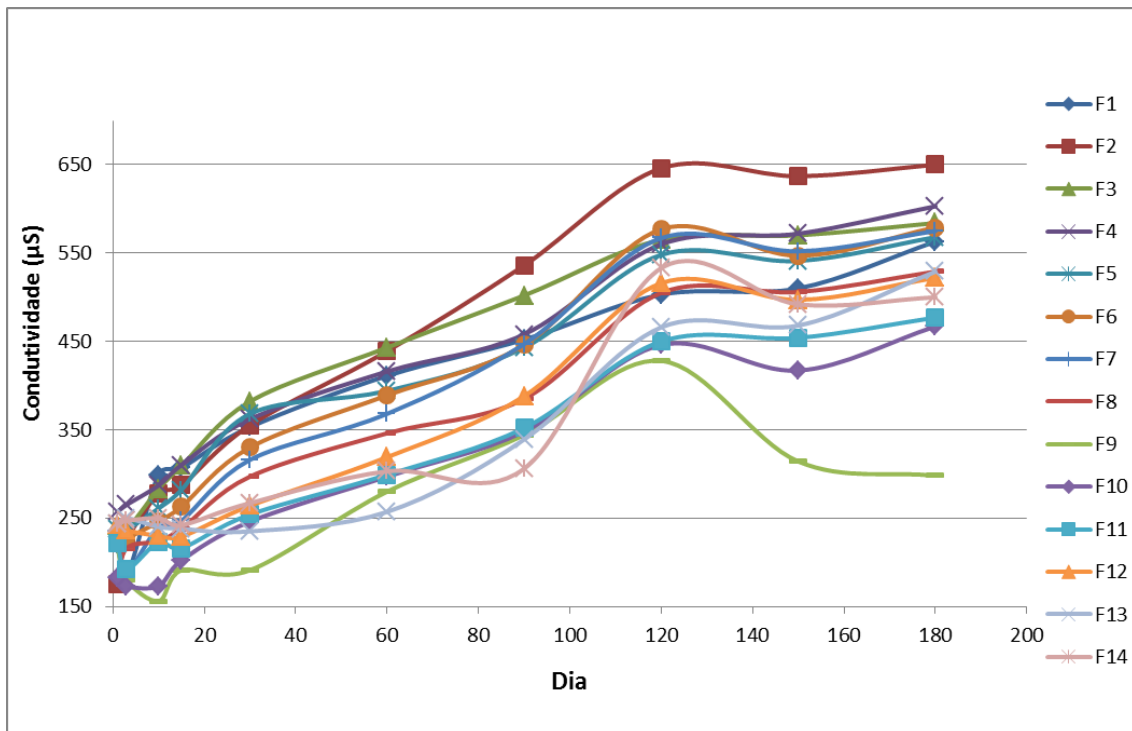


Figura V. Curvas da condutividade versus valores de EHL para cada dia de experimento

O conjunto completo de resultados indicaram que os sistemas com valores de EHL entre 11,7 e 10,7 eram as mais estáveis. Mas com base nos resultados experimentais anteriormente, o valor de EHL para a formulação contendo Limoneno foi encontrado para ser de 10,7, uma vez que essa apresentou a maior estabilidade em todos os parâmetros analisados.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O valor de EHL para a formulação contendo Limoneno foi encontrado para ser de 10,7, uma vez que essa apresentou a maior estabilidade em todos os parâmetros analisados.

Para esse estudo, a caracterização e o estudo de estabilidade realizados revelam-se como ferramentas valiosas para identificar os melhores sistemas de emulsão durante o desenvolvimento de transportadores lipídicos.

Demonstra-se também nesse trabalho que é possível a formulação de uma emulsão utilizando óleos essenciais. Estudos futuros podem ser desenvolvidos para ensaiar a influência da adição de excipientes farmacêuticos na formulação a fim de melhorar as propriedades farmacológicas do limoneno bem como realizar um estudo mais aprofundado da estabilidade desta formulação, com a realização, por exemplo, de um diagrama de fase.

2.5 AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Psicofarmacologia por ceder o óleo para desenvolvimento do trabalho e à Farmácia Escola por ceder espaço físico, material de trabalho e disponibilidade dos funcionários para a realização dos experimentos.

2.6 BIBLIOGRAFIA

1. AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology*, v.72, p. 1605-1621, 2006.
2. ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.1, p.117-26, 2008.
3. ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? *TRENDS in Parasitology*, v.21, p.462-468, 2005.
4. ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R. LIMA, E.O. SOUSA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M,S,V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Rev Bras Farmacogn* 16: 307-311, 2006.
5. BAGETTA, G. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, v. 81, n. 6, p. 453-61, Sep 2010.
6. BAI, N.; HE, K.; ROLLER, M.; LAI, C.; SHAO, X.; PAN, M.; HO, C.; *J. Agric. Food Chem.* 58, 5363, 2010; BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK I.; JOVIN, E.; *J. Agric. Food Chem.* 55, 7879, 2007.
7. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. *Rev. Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.2008
8. BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitoria: Edufes, 624p, 2008.
9. BARROS, N. F.; NUNES, E. D. Medicina alternativa e complementar no Brasil: um conceito e diferentes significados. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2023-39, 2006.
10. BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.6932-6938, 2004.
11. BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Em *Food Flavour Technology*; Taylor A. J., ed.; cap. 3. 2002.
12. BISAL, S.; BHATTACHARYA, P.K.; MOULIK, S.P. Conductivity study of microemulsions. Evaluation of hydration of oil/water microemulsions applying Bruggeman equation. *J Phys Chem.* 94 (10):4212–6, 1990
13. BONON, A.J. Obtenção de monômeros naturais através da epoxidação de limoneno . Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, 2012.
14. BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa. Resolução (RDC) nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 de novembro de 2014.

15. BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Brasília, 2006a.
16. BRITO, M. R.; SENNA-VALLE, L.; *Acta Bot. Bras.* 25, 363. 2011; AMORIM, A. C.; LIMA, C. K.; HOVELL, A. M.; MIRANDA, A. L.; REZENDE, C. M.; *Phytomedicine*, 16, 923, 2009.
17. BUSATTA, C. Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* e em Alimentos dos extratos de Orégano e Manjerona. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai das Missões, Erechim- RS. 2006.
18. CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-8, 2011a.
19. CAMPÊLO, L.M.L.; SÁ, C.G.; ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H.C.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. *Die Pharmazie*, v. 66, n. 8, p. 1-5, 2011b.
20. CHAUDHARY, S.C.; SIDDIQUI, M.S.; et. Al. D-limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. *Human and Experimental Toxicology*, v.31, p.798-811, 2012.
21. COMAS, D.I.; WAGNER, J.R.; TOMAS, M.C. Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein- lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*. Oct; 20 (7): 990-6, 2006.
22. CORAZZA, S. Aromacologia: uma ciencia de muitos cheiros. Sao Paulo: SENAC-São Paulo, 2004.
23. CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C.; *Quim. Nova*, 16, 224, 1993.
24. CROWEL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *American Society for Nutritional Sciences*, v.129, p.775S-778S, 1999.
25. DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 265, 2001.
26. DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product – A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester(546 pp), 2009.
27. DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, v.10, n.5, p. 1040-9, 2010.
28. DO AMARAL, J.F.; SILVA, M.I G.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; DE MELO, C.T.V.; et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)- Limonene in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.30, n.7, p.1217-1220, 2007.
29. EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 4, p. 308- 23, Apr, 2007.

30. ELQUIO, E.; OLIVEIRA; SOARES, L.A.L. Development and Evaluation of Emulsions from Carapa guianensis (Andiroba) Oil AAPS PharmSciTech, Vol. 11, No. 3, September 2010.
31. FATURI, C.B., LEITE, J. R., ALVES, P.B., CANTON, A. C., TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 34: 605-609. 2010
32. FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. Flavour Fragrance Journal, v. 25, p. 112-113, 2010.
33. GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; HEISS, E.; NEUMANN, I.; GAMAL-ELDEEN, A.; KNAUFT, J.; LIU, G.Y.; SITTHIMONCHAI, S.; FRANK, N. *Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents*. Mutat. Res 523: 163-172, 2003.
34. <http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br/iah/P/verbetes/peckteo.htm>, acessada em Dezembro 2008; *Chemisches Central-Blatt, band II*, 1206, 1896
35. IBRAHIM, M.A.; PIRJO, K.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insectidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*, v. 10, p.243-259, 2001.
36. IGIMI, H.; HISATSUGU, T.; NISHIMURA, M. "The use of d-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. Am. J. Dig. Dis. 21: 926-939, 1976.
37. JAENSON, T.G.T.; PALSSON, K.; BORK-KARLSON, A.K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. Medical and Veterinary Entomology. v. 19: p.345-352, 2005.
38. KEINAN, E.; ALT, A.; AMIR, G.; BENTUR, L.; BIBI, H.; SHOSEYOV, D. *Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats*. Bioorg. Med. Chem. 13: 557-562, 2005.
39. KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2839-2845, 1995.
40. LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A. ; KANIG, J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3th. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 514-517, 1986
41. LARSEN, S.T.; HOUGAARD, K.S.; HAMMER, M.; ALARIE, Y.; WOLKOFF, P.; CLAUSEN, P.A. ; *et al.* Effects of R-(+)- and S-(-)-limonene on the respiratory tract in mice. *Hum. Exp. Toxicol*, v.19, n.8, p.457-66, 2000.
42. LEITE, M.P.; FASSIN, J.R. J.; BAZILONI, E.M.F; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Rev Bras Farmacogn* 18 (Supl.): 661-666, 2008.

43. LIEBERMAN, H.; Pharmaceutical dosage forms- disperse systems. New York: M. Dekker: 1998.
44. LIESHOUT, E.M.; POSNER, G.H.; WOODARD, B.T.; PETERS, W.H. *Effects of the sulforaphane analog compound 30, indole-3-carbinol, D-limonene or relafen on glutathione S-transferases and glutathione peroxidase of the rat digestive tract* Biochim Biophys Acta. ; 1379: 325-36, 1998.
45. LIMONENE MONOGRAPH. Cri. Rev. Food Sci. Nutr. 39: 260-265, 1999.
46. MACEDO, J.P.; FERNANDES, L.L.; FORMIGA, F.R.; REIS, M.F.; JUNIOR, T.N.; SOARES, L.A; et al. Micro- emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. AAPS PharmSciTech. 7(1): E21, 2006.
47. MANUFACTURERS' ASSOCIATION *D-Limonene Monograph*, 1 -4, Flavor and Extract Manufacturers' Association; Washington, 1991.
48. MORAES, T. M. Avaliação do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. e limoneno como adjuvantes no tratamento da artrite reumatóide em ratos com úlceras gástricas - Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 2012.
49. NONINO, E. A.; *Perf. Flav.* 22, 53, 1997.
50. OLIVEIRA, A.G; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quím Nova* ; 7(1): 131-8, 2004.
51. ORAFIDIYA, L.O.; OLADIMEJI, F.A. Determination of the required HLB values of some essential oils. *Int J Pharm.* 237 (1/2):241–9, 2002.
52. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Traditional medicine: definitions*. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acessado em: 23 de nov. 2013.
53. PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.C.T. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. *Rev Bras Farmacogn* 18: 686-689, 2008.
54. PERGENTINO DE SOUZA, D.; FARIAS NÓBREGA, F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)- carvone in the central nervous system: a comparative study. *Chirality* 19: 264-268, 2007.
55. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; *Quim. Nova*, 25, Suplemento 1, 45, 2002.
56. PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. p.443-461. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SENSSEL, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000p, 2002.
57. PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Técnica farmacêutica e farmácia galénica. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 518p, 1990.

58. QIU, J. et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE, v.6, n.1, 2011.
59. RAHATE, A.R.; NAGARKAR, J.M.; Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic surfactants for cosmetic applications. J Dispers Sci Technol. 28(7):1077–80, 2007.
60. RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. Toxicol, v.39, p.603-613, 2001.
61. ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.C.H.C.L. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, p.1895-1901, 2003.
62. ROZZA, A.L., et. Al. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chem. Biol. Interact.*, v.189, p.82-89, 2011.
63. 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.
64. SAITO, H.; SHINODA, K. The stability of W/O type emulsions as a function of temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. - *J. Colloid Interface Sci.*, 32, 647-651, 1970.
65. SANTOS, A. L.; CHIERICE, G.O.K. S.; ALEXANDER, R.I.G.A. A.; MATTHEWS E.; *JTAC*, 96, 821, 2009.
66. SHARMA, M.K.; SHAH, D. Introduction to macro – and microemulsions. In: SHAH, D.O. (Ed.). *Macro- and microemulsions theory and applications*. Washington: American Chemical Society, cap.1, p. 2, 1985
67. SILVA, A. R. Tudo sobre aromaterapia. Sao Paulo: Roca, 624 p, 1998.
68. SILVA, E.C; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. *Cosmet Toiletries*; 8(5):37-46, 1996.
69. SILVA, M.I.G.; DE AQUINO NETO, M.R.; et. Al. Central nervous system activity of acute administration of isopugelol in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 88, n.2, p. 141-147, 2007.
70. SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A.; *Rev. Bras. Pl. Med.* 8, 14, 2006.
71. SONG, M.G.; CHO, S.H.; KIM, J.Y.; KIM, J.D. Novel evaluation method for the water-in-oil (W/O) emulsion stability by turbidity ratio measurements. *Korean J Chem Eng.* 19(3):425–30, 2002.

72. SONG, M.G.; CHO, S.H.; KIM, J.Y.; KIM, J.D. Rapid evaluation of water-in-oil (W/O) emulsion stability by turbidity ratio measurements. *Korean J Coll and Inter Sci.*;230:213–5, 2000.
73. SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacogn* 17: 170-175, 2007.
74. SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research*, v.25, n.2, p. 215-20, 2011.
75. SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.; HENRIQUES, M.G. *Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. Pharmazie.* 58: 582-586, 2003.
76. SUN, J. *D-Limonene: Safety and clinical applications. Altern. Med. Rev.*12: 259-264. 2007.
77. TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v.108/109, p.227-258, 2004.
78. TORO-ARREOLA, S.; FLORES-TORALES, E.; TORRES-LOZANO, C.; DEL TORO-ARREOLA, A.; TOSTADO-PELAYO, K.; DANERINAVARRO, A. *Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. Int Immunopharmacol.* 5: 829-38, 2005.
79. UEDO, N.; TATSUTA, M.; LISH, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-NO-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Letters*, v. 137, p.131-136, 1999.
80. ULRICH, H. *Manual prático de aromaterapia.* Porto Alegre: Premier, 260 p, 2004.
81. VAN RUTH, S.M.; ROOZEN, J.P.; POSTHUMUS, M.A.; JANSEN, F.J. Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation: influence of pH. - *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4365-4369, 1999.
82. VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, Sao Paulo. v. 29, n. 2, p. 326-337, Abr. 2006.
83. WEI, A.; SHIBAMOTO, T. *Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. J. Agric. Food Chem.* 55: 1737-42, 2007.
84. XAVIER JUNIOR, F.H. Emulsões de óleo de Copaíba: Determinação do equilíbrio Hidrófilo - lipófilo crítico (EHLc), propriedades e estabilidade físico - químicas. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde, 2011.
85. YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, n.1, p.147-52, 2001.